

## Аутоиммунные заболевания у детей: чему может научить опыт детских гематологов-онкологов?

К.И. Киргизов<sup>1,2</sup>, Е.В. Скоробогатова<sup>1</sup>, Э.Ю. Волкова<sup>1</sup>, С.В. Пилия<sup>1</sup>, О.Л. Благодарова<sup>1</sup>,  
Е.А. Пристанскова<sup>1</sup>, В.В. Константинова<sup>1</sup>, Н.В. Сидорова<sup>1</sup>, Р.Ц. Бембеева<sup>3</sup>, А.А. Бологов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, Москва; 117997, Россия, Москва, Ленинский пр-т, 117;

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва; 117198, Россия, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Минздрава России, Москва; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Кирилл Игоревич Киргизов podgo@yandex.ru

**Введение.** Сегодня проблема терапии аутоиммунных заболеваний (АЗ) приобретает высокую актуальность. Стратегией достижения успеха является взаимодействие врачей различных специальностей. Один из передовых подходов к лечению данной группы заболеваний – объединение усилий с врачами гематологами-онкологами.

Вариантом подобного взаимодействия является пример успешного лечения детей с рефрактерными формами рассеянного склероза (РС) с применением клеточной терапии или аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). В статье представлен краткий обзор по терапии АЗ с фокусом на ведение пациентов с РС.

**Материалы и методы.** В анализ были включены 13 пациентов с РС. Распределение по полу: 9 девочек (69,2 %) и 4 мальчика (30,8 %). Медиана возраста – 16,7 ± 1,7 года. Медиана длительности заболевания до проведения лечения – 15,5 ± 4,1 года. Возраст дебюта заболевания – 4–14 лет (12,3 ± 1,7 года). Средняя оценка по расширенной шкале инвалидизации (EDSS) – 6,16 ± 0,2 балла. У всех пациентов было зафиксировано тяжелое рефрактерное течение заболевания. До момента начала терапии представленными в статье методами больные получали лечение глюкокортикостероидами, интерферонами, плазмаферезом и митоксантроном с негативными результатами. Все пациенты в группе ауто-ТГСК начинали терапию с признаками аутоиммунного воспаления. В контексте протокола по клеточной терапии выполнялись трансфузии ex vivo культивированных Т-регуляторных клеток. В случае проведения ауто-ТГСК применялась схема кондиционирования с использованием комбинации циклофосфида (200 мг/кг) и препарата атгам (160 мг/кг).

**Результаты.** У пациентов, получавших терапию аутологичными Т-регуляторными клетками, сохранялась ремиссия без эпизодов обострений. У всех детей после ауто-ТГСК было зафиксировано быстрое улучшение в раннем посттрансплантационном периоде. Максимальное улучшение оценки по шкале EDSS составило 5,5 балла. В статье представлен опыт длительного наблюдения пациентов данной группы (максимальный период наблюдения 60 мес). В результате терапии не было зафиксировано серьезных побочных реакций. Только у 2 пациентов на поздних сроках случилось повторное обострение заболевания.

**Выводы.** Таким образом, представленные методы терапии показали свою эффективность в контексте рефрактерных форм РС и могут быть транслированы на другие виды АЗ.

**Ключевые слова:** дети, аутоиммунные заболевания, рассеянный склероз, системный склероз, иммуносупрессия, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, терапия рефрактерных форм, побочные действия, эффективность иммуносупрессивной терапии

### Autoimmune diseases of children: what can be learned from the experience of pediatric hematologist and oncologists?

К.И. Kirgizov<sup>1,2</sup>, E. V. Skorobogatova<sup>1</sup>, E. Yu. Volkova<sup>1</sup>, S. V. Piliya<sup>1</sup>, O. L. Blagodarova<sup>1</sup>, E. A. Pristanskova<sup>1</sup>, V. V. Konstantinova<sup>1</sup>,  
N. V. Sidorova<sup>1</sup>, R. Ts. Bembeyeva<sup>3</sup>, A. A. Bologov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian Children's Clinical Hospital, Ministry of Health of Russia, Moscow; 117, Leninskiy ave., Moscow, Russia, 117997;

<sup>2</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Samory Mashela st., Moscow, Russia, 117198;

<sup>3</sup>N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997

**Introduction.** Today, the problem of therapy of autoimmune diseases has acquired high relevance. The strategy of achievement of success is interaction of doctors of various specializations. One of the advanced approaches to treatment of this group of diseases is joining of efforts with hematologists and oncologists.

A variant of such interaction is an example of successful treatment of children with refractory forms of multiple sclerosis or cell therapy with the use of autologous transplantation of hematopoietic stem cells. The article represents a brief review of therapy of autoimmune diseases with the focus on observation of patients with multiple sclerosis.

**Materials and methods.** 13 patients with multiple sclerosis were included into the analysis. Distribution of sexes: 9 girls (69.2 %) and 4 boys (30.8 %). Age median: 16.7 ± 1.7 years. The median of duration of the disease prior to treatment is 15.5 ± 4.1 years. The age of onset of the disease is 4 to 14 years (12.3 ± 1.7 years). The average point in accordance with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) is 6.16 ± 0.2

points. A severe refractory course of disease was registered with all patients. Until the moment of commencement of the therapy with the methods represented in the article, the patients received treatment with corticosteroids, interferon, plasmapheresis, and mitoxantrone with negative results. All patients in the group of autologous transplantation commenced the therapy with the signs of autoimmune inflammation. Transfusions of ex vivo cultivated T-regulatory cells were applied in the context of protocol regarding the cell therapy. The conditioning scheme with the use of the combination of cyclophosphamide (200 mg/kg) and atgam drug (160 mg/kg) was used in the case of performance of autologous transplantation.

**Results.** Remission without aggravation episodes was maintained with the patients that received therapy with autologous T-regulatory cells. Rapid improvement in the early post-transplantation period was registered with all children after auto-TGSC. The maximum improvement under the EDSS scale comprised 5.5 points. The article represented the experience of long-term observation of patients of this group (the maximum observation period is 60 months). No serious side effects were registered as a result of the therapy. Only 2 patients at late terms demonstrated repeated aggravation of the disease.

**Conclusions.** Thus, the presented methods of therapy demonstrated their efficiency in the context of refractory forms of multiple sclerosis and can be translated to other types of autoimmune diseases.

**Key words:** children, autoimmune diseases, multiple sclerosis, systemic sclerosis, immunosuppression, autologous hematopoietic stem cell transplantation, therapy of refractory forms, side effects, efficacy of immunosuppressive therapy

### Введение

Аутоиммунные заболевания (АЗ) — группа разнообразных по клиническим проявлениям патологий, развивающихся вследствие патологической выработки аутоиммунных комплексов и/или увеличения числа аутоагрессивных эффекторных клеток против здоровых клеток организма, приводящих к повреждению и разрушению данных клеток и развитию аутоиммунного воспалительного процесса. Сегодня АЗ страдают около 5–7 % населения Земли.

### Исторические аспекты

В начале XX столетия Пауль Эрлих впервые обнаружил, что организм способен развивать иммунные реакции не только против чужеродных патогенов, но и против собственных тканей и клеток. Эту способность к аутоиммунным реакциям он обозначил термином «ужасный аутоксикоз» (horror autotoxicus).

### 1960-е годы

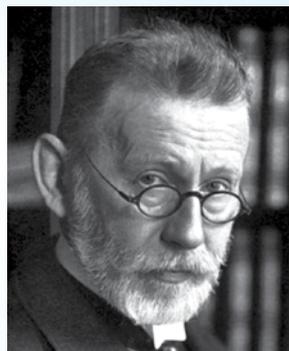
Благодаря развитию лабораторной диагностики в это время впервые были описаны аутоантитела при синдроме Шегрена (U. Vertram, P. Halberg, 1965), а на животных моделях показано формирование аутоантител против эритроцитов при ряде анемий (A. Sundermann, U. Mey, 1965). На основании клинических наблюдений выдвинута теория вирус-ассоциированного развития АЗ.

### 1970-е годы

В 1975 г. впервые была обнаружена связь гемолитического стрептококка и АЗ (P.A. Bastenie, 1975). Продолжались работы и по изучению специфических «маркеров» аутовоспаления — например, было обнаружено повышение концентрации микроглобулина-2 в слюне при аутовоспалении у пациентов с синдромом Шегрена (Michalski, 1975). Во второй половине 70-х годов XX века также произошло важное событие — было сформулиро-



### Пауль Эрлих (1854–1915)



П. Эрлих является одним из ведущих ученых конца XIX — начала XX века. В 1908 г. совместно с И.И. Мечниковым он стал лауреатом Нобелевской премии за работы в области иммунологии. П. Эрлих работал в различных областях медицинской биологии, биохимии, физиологии и др.

Он стал одним из авторов работ по изучению кроветворения, функций костного мозга и гематоэнцефалического барьера. П. Эрлих впервые высказал идею о том, что клетки, ответственные за иммунные реакции, имеют на поверхности антигенраспознающие структуры — рецепторы. В области интересов П. Эрлиха были также лейкемии и злокачественные новообразования.

Мировую славу П. Эрлиху принес разработанный им «препарат 606» (сальварсан), который оказался высокоэффективным при лечении сифилиса.

вано понятие «иммунная толерантность». Начато широкое применение иммуносупрессивных препаратов.

### 1980–1990-е годы

В середине 1980-х годов произошел прорыв, связанный с обнаружением различных аутоантигенов, играющих роль в развитии АЗ, что впоследствии позволило применять для ряда случаев таргетное воздействие (D.O. Willenborg, 1996). В эти годы стал широко применяться большой спектр иммуносупрессивных

препаратов. В начале 1990-х годов были выполнены первые аутологичные трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) при АЗ.

### 2000–2010-е годы

Происходит широкое внедрение моноклональных антител и ауто-ТГСК, появляются работы, показывающие эффективность аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) при ряде заболеваний. Был определен список большинства специфических антигенов (табл. 1) и выявляемых факторов (табл. 2) при АЗ [1].

### Подходы к классификации и диагностике

В настоящее время существует множество подходов к классификации АЗ. В данном обзоре будет рассмотрена классификация на основании того, что поражается данным заболеванием: органоспецифические и системные АЗ [1].

При органоспецифических АЗ аутоантитела и аутореактивные лимфоциты направлены против одного органа и только в нем индуцируют иммунопатологические реакции. При системных АЗ вырабатываемые аутоантитела и аутореактивные Т-лимфоциты реагируют с широким спектром антигенов, представленных на разных клетках и тканях. В основе развития аутоиммунных процессов лежат дефекты в процессах иммунорегуляции и гиперреактивность организма. Нередко у одного и того же больного развивается несколько форм АЗ. При этом системные АЗ чаще возникают в зрелом возрасте. В целом данные заболевания чаще развиваются у женщин, чем у мужчин.

### Органоспецифические АЗ:

- аутоиммунный тиреоидит;
- болезнь Грейвса (диффузный токсический зоб);
- атрофический гастрит;

Таблица 1. Основные антигены и АЗ, вызываемые ими

Антиген	Заболевание
Белки мембран эритроцитов	Аутоиммунная гемолитическая анемия
Белки тромбоцитов	Идиопатическая тромбоцитопения
Коллаген базальной мембраны клубочков почки	Синдром Гудпасчера
Тиреотропный рецептор	Болезнь Грейвса
Тиреоглобулин, микросомы	Болезнь Хашимото
Альфа-глиадин	Целиакия
Бета-клетки поджелудочной железы, декарбоксилаза глутаминовой кислоты, инсулиновый рецептор, тирозинфосфатаза 1А-2	Инсулинозависимый сахарный диабет
Ацетилхолиновые рецепторы	Тяжелая миастения
Основной белок миелина	Рассеянный склероз (РС)
Париетальные клетки желудка, внутренний фактор	Пернициозная анемия
ДНК-топоизомераза, РНК-полимераза	Прогрессирующий системный склероз
Fc-фрагмент IgG, коллаген	Ревматоидный артрит
Тирозиназа	Витилиго
Двухспиральная ДНК, кардиолипид, факторы свертывания крови, Sm, RD, RNP	Системная красная волчанка
Глиадин, ретикулин	Герпетиформный дерматит
Антиген базальной мембраны кожи	Буллезный пемфигоид
Антиген передней камеры глаза	Увеит
Антиген сосудистой оболочки глаза	Симпатическая офтальмия
Митохондрии	Первичный билиарный цирроз
Smooth muscle, ядерный антиген гепатоцита	Хронический активный гепатит
Ядерные антигены: SS-A, SS-B	Синдром Шегрена
Ядерный антиген Go-1, антиген скелетных мышц	Дерматополимиозит
Ядерный антиген Scl-70	Склеродермия
Ядерный антиген RNP	Смешанные заболевания соединительной ткани
Антиген толстой кишки	Неспецифический язвенный колит
Антиген кишечника ( <i>Escherichia coli</i> )	Болезнь Крона

Таблица 2. Характеристика факторов, способствующих развитию АЗ, и методы их диагностики

Заболевание	Выявляемый фактор	Методы обнаружения
Болезнь Хашимото	Аутоантитела к тиреоглобулину и микросомальному антигену	Иммуноферментный анализ
Мужское бесплодие	Аутоантитела к спермиям	Реакция агглютинации, иммобилизации спермиев
Вульгарная пузырчатка	Антитела к десмосомам шиповидных клеток эпидермиса	Иммуноферментный анализ препаратов кожи
Пемфигоид	Аутоантитела к базальной мембране эпидермиса	Иммуноферментный анализ препаратов кожи
Факогенный увеит	Аутоантитела к антигенам хрусталика	Иммуноферментный анализ
Симпатическая офтальмия	Сенсибилизированные лимфоциты	Кожная реакция гиперчувствительности замедленного типа на увеальный экстракт, тест ингибиции миграции лейкоцитов в присутствии специфического антигена
Аутоиммунная гемолитическая анемия	Аутоантитела к эритроцитам	Реакция Кумбса с применением антиглобулинового реагента, агглютинация при 4 °С, гемолитические тесты с эритроцитами
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура	Аутоантитела к тромбоцитам	Сокращение времени жизни тромбоцитов <i>in vitro</i> , реакция агглютинации, лизиса тромбоцитов
Первичный билиарный цирроз печени	Аутоантитела к митохондриям	Иммуноферментный анализ
Ревматоидный артрит	Аутоантитела к Ig	Антиглобулиновый тест, агглютинация частиц латекса, соединенных с Ig
Системная красная волчанка	Аутоантитела к нуклеопротеину, нативной и денатурированной ДНК, рибосомной РНК	Иммуноферментный анализ
Тяжелая миастения	Аутоантитела к ацетилхолиновым рецепторам	Иммуноферментный анализ
Рассеянный множественный склероз	Аутоантитела к основному белку миелина	Иммуноферментный анализ

- болезнь Аддисона;
- иммунное бесплодие;
- инсулинозависимый сахарный диабет;
- факогенный увеит;
- интерстициальный неврит;
- аутоиммунная гемолитическая анемия;
- синдром Гудпасчера;
- идиопатическая тромбоцитопения;
- миастения гравис;
- пернициозная анемия;
- постстрептококковый гломерулонефрит;
- аутоиммунная тромбоцитопения;
- аутоиммунная нейтропения;
- неспецифический язвенный колит;
- болезнь Крона.

#### Системные АЗ:

- анкилозирующий спондилит;
- РС;
- ревматоидный артрит;
- системная красная волчанка;
- склеродермия;
- синдром Шегрена;

- дерматополимиозит;
- болезни соединительной ткани.

В настоящее время для диагностики АЗ применяют так называемые абсолютные и косвенные показатели [1, 2]. К абсолютным относятся: наличие в сыворотке специфических аутоантител; наличие в крови сенсибилизированных Т-лимфоцитов; повышенное содержание в сыворотке иммунных комплексов или наличие их в тканях; лимфоцитарная инфильтрация ткани. К косвенным показателям АЗ относятся: нарушения в популяционном и субпопуляционном составе лимфоидных клеток (повышенное содержание CD4<sup>+</sup>-клеток, В-лимфоцитов); повышение уровня гамма-глобулинов и/или IgG; снижение уровня С3- и С4-компонентов комплемента; наличие в сыворотке аутоантител разной специфичности [1, 3, 4].

#### Терапевтические опции

В настоящее время для терапии АЗ применяется широкий спектр иммуносупрессивных препаратов, аппаратных методов гемокоррекции и клеточной терапии [1, 4]: глюкокортикостероиды (ГКС), внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ), плазмаферез, имму-

номодуляторы, цитостатики, биологически активные агенты (блокаторы фактора некроза опухоли  $\alpha$ , блокаторы дифференцировки Т-лимфоцитов), таргетные препараты, клеточная регуляторная терапия, ауто- и алло-ТГСК. Важно отметить, что все препараты четко распределены по линиям терапии. При этом необходимо строго соблюдать очередность применения препаратов с быстрым «переключением» на следующую линию терапии при неэффективности предыдущей.

#### Терапия 1-й линии

ГКС, ВВИГ, иммуномодуляторы (глатирамера ацетат, интерферон- $\beta$ ).

#### Терапия 2-й линии

Цитостатики (митоксантрон, азатиоприн).  
Иммунодепрессанты (микофенолата мофетил).  
Таргетные препараты (ритуксимаб).  
Блокаторы фактора некроза опухоли  $\alpha$ .

#### Терапия 3-й линии

Клинические исследования агентов: кладрибин, алемтузумаб, лаквинимод, окрелизумаб, даклизумаб.

Клеточная регуляторная терапия.

Высокодозная химиотерапия с последующей реинфузией аутологичных стволовых клеток.

Алло-ТГСК.

В контексте данной статьи важно отметить роль клеточной регуляторной терапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

#### Клеточная регуляторная терапия

Стоит отметить, что в последние годы активно изучается возможность использования различных вариантов клеточной терапии при АЗ. Одним из первых клеточных субстратов для терапии АЗ стали мезенхимальные стволовые клетки (МСК). В исследованиях было показано, что терапия МСК позволяет добиться замедления Т-клеточного ответа на стимуляцию ауто- и аллоантигенами, митогенами и микроорганизмами *in vitro*, уменьшения экспрессии CD4<sup>+</sup> активационных маркеров, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD69 и снижения Т-клеточной активации *in vivo*. МСК способствуют увеличению содержания Т-регуляторов, снижению пролиферации В-лимфоцитов и подавлению продукции интерферона- $\gamma$ , интерлейкинов 4 и 10.

Так, в одном из исследований пациентам с РС ( $n = 15$ ) и боковым амиотрофическим склерозом ( $n = 19$ ) интратекально вводились МСК, меченные супероксидом железа (в среднем  $63,2 \pm 2,5$  млн). При этом внутривенная инфузия МСК проводилась у 12 пациентов. Через 24 ч по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) отмечалась миграция МСК в менингеальные оболочки, субарахноидальные пространства, затылочные рога боковых желудочков, паренхиму спинного

мозга [5]. Однако в рамках данного исследования не была показана значимая эффективность метода, а сама процедура не соответствовала современным стандартам безопасности пациентов.

В настоящее время ключевую роль в поддержании толерантности иммунной системы, в особенности в контексте АЗ, исследователи отдают Т-регуляторным лимфоцитам CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Т-регуляторам) [6–8]. Т-регуляторы в норме составляют 3–5 % общего числа CD4<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови и лимфоидных тканях. Созревание Т-регуляторов происходит в тимусе, после чего они «расселяются» в кровь и органы лимфоидной системы [9, 10]. Т-регуляторы принимают участие в поддержании иммунологической толерантности за счет подавления пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибции активности естественных киллеров, макрофагов и В-клеток [7, 8].

В ряде исследований было показано, что именно снижение числа Т-регуляторов и дефект их функции могут обуславливать развитие различных АЗ – системной красной волчанки, сахарного диабета 1-го типа, псориаза и ревматоидного артрита [6, 11]. Было показано, что Т-регуляторы играют роль в развитии аутоиммунной агрессии, приводящей к дальнейшему прогрессированию АЗ. При этом ряд современных исследований демонстрируют количественное снижение уровня Т-регуляторов в периферической крови пациентов с РС как в период обострения, так и вне его [7, 8]. С другой стороны, было показано, что вне обострения при эффективном применении терапии их уровень значимо повышается [10]. Важным аспектом иммунопатологического процесса при АЗ является и нарушение супрессорной активности Т-регуляторов, а в литературе установлено достоверное снижение их функциональной активности у пациентов с АЗ [9]. Таким образом, Т-регуляторы могут являться одним из факторов оценки эффективности проводимого лечения АЗ.

В настоящее время имеется убедительный опыт, свидетельствующий о возможности увеличения числа Т-регуляторов, выделенных из крови пациентов, с помощью культивирования *ex vivo*. Важно отметить, что данные клетки являются стабильным долгоживущим субстратом с хорошими супрессорными свойствами. При этом введение подобных клеток позволяет добиться значимого роста их числа в периферической крови с целью коррекции АЗ. Существуют публикации, посвященные эффективности аутологичных культивированных *ex vivo* Т-регуляторов при различных АЗ и после ТГСК. При этом была получена корреляция улучшения клинических показателей пациентов с повышением количества Т-регуляторов в периферической крови, побочных эффектов отмечено не было [7, 10, 12].

Помимо этого, имеются работы, показывающие эффективность и безопасность введения Т-регулято-

ров пациентам с АЗ, однако эти работы представляют опыт терапии во взрослой популяции [6–10, 12].

### **Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток**

Ауто-ТГСК в настоящее время является одним из рутинных методов, применяемых в детской гематологии-онкологии, иммунологии и других областях медицины [13]. Данный метод широко используется и при терапии АЗ. Так, первая ауто-ТГСК при АЗ была проведена в 1993 г. для лечения пациента со склеродермией [14]. Эти работы связаны с именем профессора А. Мармона (рис. 1). Важно отметить, что в контексте АЗ применяется как ауто-, так и алло-ТГСК. При ауто-ТГСК целью является «перезагрузка» иммунной системы с восстановлением иммунологической толерантности, а при алло-ТГСК – «замена» иммунной системы с формированием эффекта «трансплантат против аутоиммунитета» [14].

### **Рассеянный склероз как модель аутоиммунных заболеваний**

РС является наиболее распространенным хроническим воспалительным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы и основной причиной инвалидизации лиц молодого возраста [15–19]. В настоящее время в мире насчитывается около 3 млн больных РС, распространенность его в целом составляет 1:1000 населения. Исходя из данного показателя, в России может быть около 150 000 больных РС [2, 3, 9, 16].

Типичным возрастом клинического проявления РС считается 20–40 лет, но в 2–7 % всех случаев дебют РС приходится на детский возраст [17, 20, 21].

Актуальность изучения РС у детей продиктована наметившейся в последние годы тенденцией к росту заболеваемости, обусловленной истинным увеличением числа заболевших, улучшением качества диагнос-

тики и появлением новых методов и средств патогенетической терапии.

РС рассматривают как иммунологически опосредованное заболевание, при котором аутоиммунный ответ индуцируется одним или несколькими экзогенными агентами у генетически предрасположенного индивидуума [17, 22, 23].

По современным представлениям, развитие АЗ связано с нарушением супрессорных механизмов, которые контролируют толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам [3, 7, 24, 25]. При этом значимая роль в патогенезе РС отводится регуляторным Т-лимфоцитам CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Т-регуляторам), которые участвуют в поддержании иммунологической толерантности за счет подавления пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибиции активности естественных киллеров, макрофагов и В-клеток [7–10]. Исходя из этого, изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови может служить надежным способом мониторинга активности воспаления и эффективности проводимого лечения [9, 26].

В терапии РС ключевую роль играет своевременное назначение адекватной терапии [2, 15, 27, 28]. Несвоевременное неадекватное лечение при РС приводит к значительной инвалидизации пациентов и иногда представляет угрозу жизни ребенка. В настоящее время для традиционной длительной терапии РС у взрослых зарегистрирован ряд препаратов, изменяющих течение РС. Опубликованные данные международных ретроспективных исследований говорят о безопасности и хорошей переносимости таких препаратов у детей и подростков с РС [2, 19, 20, 27, 29, 30]. Но в детском возрасте встречаются формы РС, которые имеют злокачественное течение и не отвечают на проводимую иммуномодулирующую терапию [14, 26, 31, 32], а ряд пациентов детского возраста по определенным причинам не могут получать традиционные иммуномодулирующие препараты. В этих условиях одним из перспективных направлений в терапии РС у детей может оказаться применение клеточных технологий и иммуносупрессивных препаратов в высоких дозах для достижения длительной ремиссии, эффективность которых была показана во взрослой популяции.

В настоящее время в доступной мировой литературе не выявлено работ, посвященных проведению клеточной и высокодозной иммуносупрессивной терапии для группы пациентов с РС в возрасте до 18 лет, несмотря на достаточное число публикаций, основанных на популяции взрослых пациентов, в которых описаны лишь единичные случаи рефрактерного течения РС у пациентов моложе 18 лет. Так, с 1999 г. в России проводится исследование эффективности ауто-ТГСК при РС, которое включает 6 центров, где осуществлено 180 трансплантаций. Однако ни один из этих центров не занимается лечением пациентов в возрасте до 18 лет [33].

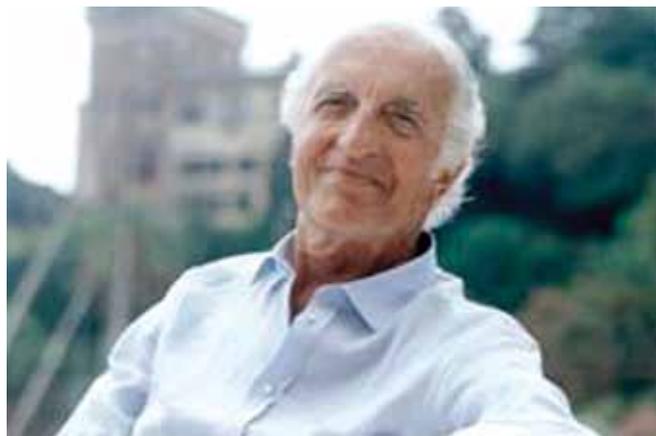


Рис. 1. Профессор А. Мармон (1918–2014). Под его руководством была выполнена первая ауто-ТГСК для пациентов с АЗ

Между тем в мире накоплен определенный опыт проведения клеточной терапии культивируемыми *ex vivo* Т-регуляторами [8, 10, 11], а также высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТГСК при рефрактерных к традиционным методам лечения формах РС. Данные терапевтические методы показали свою эффективность и безопасность при лечении РС у взрослых и могут быть рассмотрены в контексте применения у детей и подростков [13, 14, 21].

Таким образом, своевременное назначение адекватной терапии позволяет добиться хорошего эффекта. Однако в случае развития рефрактерности к проводимому лечению требуется применение препаратов 2-й и 3-й линии терапии. Далее будет представлен собственный опыт лечения пациентов детского возраста с рефрактерными формами РС.

До начала применения метода ауто-ТГСК для терапии детей с рефрактерными формами РС был проведен анализ эффективности лечения 4 пациентов с вторично-прогрессирующим РС митоксантроном в РДКБ. Митоксантрон назначался в дозе 12 мг/м<sup>2</sup> внутривенно капельно каждые 3 мес в течение 2 лет. Результат проведенной терапии отражен на рис. 2.

У пациента № 1 после 8 мес ремиссии отмечено клинико-радиологическое обострение. Побочным действием препарата явился агранулоцитоз. У пациента № 2 возросло количество контраст-позитивных очагов на МРТ. У пациента № 3 на фоне лечения митоксантроном было зафиксировано клинико-радиологическое обострение. И только пациент № 4 не имел рецидивов заболевания на протяжении всего курса терапии (2 года), но после окончания лечения вновь наступило обострение.

Особенностью режима назначения митоксантрона является необходимость длительного курса без возможности проведения пульс-терапии в связи с крайне

высоким риском кардиотоксичности данного препарата. Таким образом, митоксантрон у детей имеет ограниченные показания к применению и не может рассматриваться как средство для быстрой стабилизации состояния. Кроме того, протокол терапии с применением митоксантрона рассчитан на длительное введение средних доз химиотерапии, при этом положительный эффект в детской популяции возможен при проведении пульс-терапии высокими дозами иммуноаблаторов.

Учитывая полученные данные, был разработан протокол клеточной и высокодозной терапии с последующей ауто-ТГСК для детей с РС.

### Исследование эффективности клеточной терапии и аутотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с рефрактерными формами рассеянного склероза

#### Пациенты и методы

В исследование было включено 13 пациентов с РС в возрасте 10–17 лет, из них 9 пациентам была проведена ауто-ТГСК, 6 – клеточная терапия (2 пациентам клеточная терапия выполнялась после ауто-ТГСК). Средний возраст пациентов на момент включения в исследование составил  $14,78 \pm 3,1$  года. Длительность заболевания до включения больных в исследование в группе ауто-ТГСК составила  $28,8 \pm 13,38$  мес, в группе клеточной терапии –  $14,1 \pm 10,96$  мес. Из 13 пациентов с РС было 9 девочек (69,2 %) и 4 мальчика (30,8 %). Соотношение по полу в общей группе представлено как 2,5:1.

Все пациенты, получившие ауто-ТГСК, имели вторично-прогрессирующее течение РС с обострениями. Из 6 пациентов, которым была выполнена клеточная терапия, 4 (67 %) имели ремитирующий вариант РС, а 2 (33 %) – вторично-прогрессирующий РС.

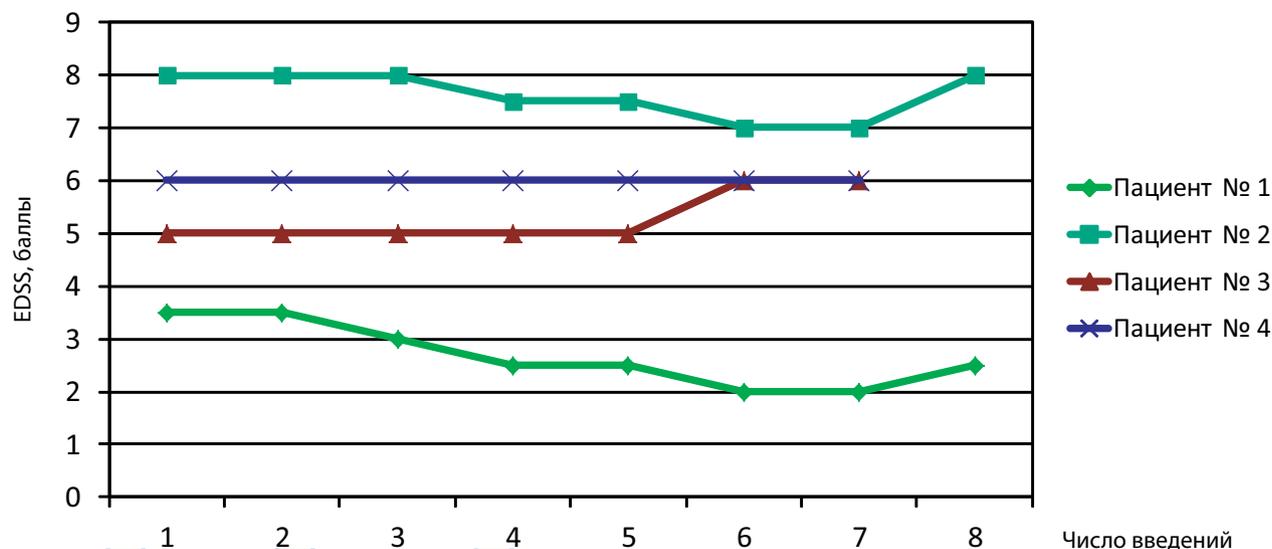


Рис. 2. Динамика оценки по шкале EDSS при терапии митоксантроном

Культивирование Т-регуляторов проводилось на базе Отдела клеточных технологий и регенеративной медицины ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (руководитель отдела — д.м.н., проф. С.Н. Быковская). Выделение регуляторных Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> из периферической крови больных РС осуществлялось инкубацией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток с мечеными фикоэритрином античеловеческими антителами к FoxP3, клон РСН101 (eBioscience, США).

Данный метод включал забор 40 мл периферической крови у пациента, выделение субпопуляций регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток донора, окраску эффекторных Т-лимфоцитов витальным красителем карбокси-флуоресцеин-сукцинимидиловым эфиром (carboxy-fluorescein succinimidyl ester — CFSE) и пролиферацию в смешанной культуре, которая оценивается по редукции внутриклеточного красителя CFSE методом проточной цитометрии.

Для культивирования Т-регуляторов применяли среду RPMI-1640, содержащую феноловый красный, L-глутамин и 25 мМ HEPES (Gibco, Великобритания), с добавлением 5–10 % аутологичной сыворотки и 1 % раствора пенициллин-стрептомицина (Gibco, Великобритания). В культуральную среду добавляли интерлейкин-2 (R&D Systems, Великобритания), мышинные моноклональные антитела к человеческому рецептору CD3 (МедБиоСпектр, Россия) и мышинные моноклональные антитела к человеческому рецептору CD28 (BD Pharmingen, США). Клетки культивировали во флаконах 25 см<sup>2</sup> или 75 см<sup>2</sup> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Свежую среду и ростовые факторы добавляли каждые 3–4 дня. Время культивирования составляло 5–8 дней. Далее оценивали фенотипические характеристики (экспрессия маркеров) и экспансию (увеличение количества) Т-регуляторов после культивирования с помощью проточной цитометрии и изучали супрессорную активность нативных и индуцированных *ex vivo* Т-регуляторов.

На 7–12-й день культивирования клетки концентрировали, подсчитывали количество живых клеток в гемоцитометре и отмывали центрифугированием в конических стерильных пробирках (50 мл) в фосфатном солевом буферном растворе без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в течение 10 мин при 300g. Осадок разводили в 2–3 мл стерильного физиологического раствора или 6 % раствора декстрана и сразу набирали в стерильный одноразовый шприц, помещали его в стерильную упаковку и в специальный контейнер для переноса клеток, который незамедлительно транспортировался в РДКБ. После доставки в отделение психоневрологии №1 РДКБ клетки немедленно вводили пациенту подкожно в область передней брюшной стенки.

С целью проведения ауто-ТГСК выполнялась мобилизация стволовых клеток периферической крови

с помощью введения циклофосфида (ЦФ) в дозе 2000 мг/м<sup>2</sup> внутривенной инфузией за 1 ч на фоне гипергидратации (3000 мл/м<sup>2</sup>) с обязательным введением препарата уромитексан в дозе 180 % от дозы ЦФ (80 % струйно перед введением ЦФ 100 % суточной инфузией начиная с 0-го часа). На +7-й день от начала инфузии ЦФ производилась стимуляция гемопоэза гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Забор стволовых клеток периферической крови выполнялся методом аппаратного афереза на аппарате Cobe Spectra до момента выделения как минимум 2 × 10<sup>6</sup> CD34-позитивных клеток на 1 кг массы тела пациента. Продукт афереза подвергался криоконсервации до момента применения на 0-й день. Интервал между инфузией ЦФ в контексте забора стволовых клеток и кондиционирования составлял не менее 3 нед.

Кондиционирование включало в себя введение ЦФ в дозе 200 мг/кг (разделенной на 4 эквивалентные дозы на –5, –4, –3, –2-й дни), атгама в дозе 160 мг/кг (разделенной на 4 эквивалентные дозы на –2, –1, +1, +2-й дни). Реинфузия стволовых клеток периферической крови проводилась на 0-й день. Для быстрого выхода из состояния аплазии кроветворения производилась плановая стимуляция гемопоэза Г-КСФ — 5 мкг/кг, начиная с +5-го дня. Разработанная схема кондиционирования с введением атгама на +1-й и +2-й дни благоприятно влияла на последующее течение заболевания в связи с Т-деплецией *in vivo* уже трансплантированных клеток, снижая до минимума риск воздействия активированных Т-лимфоцитов на пациента.

Терапия проводилась в соответствии с протоколами: «Применение Т-регуляторных клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> для лечения детей с рассеянным склерозом» и «Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей с рефрактерными формами рассеянного склероза», утвержденными на заседании Ученого Совета ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева 20 января 2011 г. (одобренны локальным этическим комитетом ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева 10 декабря 2010 г.).

#### Терапия Т-регуляторными клетками

Терапию Т-регуляторами получили 6 детей с РС. Средний возраст пациентов на момент начала терапии составил 13 ± 1,3 года. Длительность заболевания на момент включения в исследование составляла 1,4 ± 0,2 года. Всем пациентам проводилось лечение высокими дозами кортикостероидов в период обострения, 4 из 6 в анамнезе получали терапию препаратами интерферона-β<sub>1b</sub>. Средний показатель по шкале EDSS на момент начала терапии по протоколу — 3,13 ± 1,03 балла. Все пациенты (n = 6), включенные в протокол, имели изменения по данным МРТ головного и спинного мозга.

Для определения эффективности проведенной терапии оценивали нейрорадиологическую картину и суб-

популяционный состав лимфоцитов периферической крови пациентов. Одним из наиболее важных показателей аутоиммунной агрессии является иммунорегуляторный индекс (ИРИ). В группе пациентов, включенных в исследование, было установлено статистически значимое увеличение показателя ИРИ  $CD4^+/CD8^+$  ( $p = 0,01$ ) после проведения терапии аутологичными культивированными *ex vivo* Т-регуляторами.

При динамическом наблюдении данной группы пациентов до и после клеточной терапии выявлено достоверное снижение количества  $CD8^+$ -клеток ( $p = 0,006$ ) по сравнению с количеством данных клеток до введения Т-регуляторов, что обуславливает изменение ИРИ у данных пациентов. Кроме того, отмечалось достоверное снижение количества В-лимфоцитов ( $p = 0,01$ ) (табл. 3).

Однако наибольшее значение придавалось изучению популяции Т-регуляторов, которые оказывали влияние на популяцию лимфоцитов. В данном исследовании оценивалось изменение популяции Т-регуляторов у пациентов в обострении, вне обострения и в контексте проведенной терапии Т-регуляторами. Было выявлено, что содержание Т-регуляторов в периферической крови детей с РС повышалось при выходе из обострения с  $1,1 \pm 0,55$  до  $2,1 \pm 1,25$  % ( $p = 0,002$ ). Уровень вне обострения был ниже показателей здоровых лиц по данным литературы [9]. Было показано, что при переходе из стадии обострения в ремиссию происходит увеличение числа Т-регуляторов.

Учитывая полученные данные, было принято решение о необходимости экспансии числа Т-регуляторов для эффективной иммунотерапии РС. В настоящее время установлена возможность выделения и индукции *ex vivo* больших количеств Т-регуляторов. При этом клетки являются высокостабильным субстратом, долго живут и обладают высокими супрессорными свойствами, неспецифичны и неиммуногенны. Лаборатория

отдела клеточных технологий и регенеративной медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова (руководитель отдела — д. м. н., проф. С.Н. Быковская) проводила экспансию Т-регуляторов *ex vivo*, по фенотипическим и функциональным характеристикам полностью идентичным нативным, их количество после экспансии возрастает в десятки раз [7, 8].

В рамках исследования было проведено культивирование с последующим введением аутологичных Т-регуляторов 6 пациентам. У 5 из 6 пациентов через 2 нед после введения выявлено значимое увеличение содержания данных клеток в среднем с  $2,1 \pm 1,25$  до  $3,8 \pm 1,4$  % ( $p = 0,003$ ) (см. табл. 3). При этом одному из пациентов потребовалось 2 введения. Анализ показал, что уровни  $CD8^+$ -клеток и Т-регуляторов имели разнонаправленное движение у всех пациентов.

Анализ клеточности вводимого субстрата показал, что в среднем пациентам трансплантировалась фракция аутологичных культивированных *ex vivo* клеток  $(6,44 \pm 1,3) \times 10^7$  ( $4,5 \times 10^7 - 8,0 \times 10^7$ ). Метод введения у всех пациентов соответствовал протоколу — клетки вводились подкожно в область живота, реакция на введение зафиксировано не было ни у одного пациента.

Нами был проведен анализ инвалидизации по шкале EDSS (табл. 4) в контексте терапии Т-регуляторами для 6 пациентов с РС. Средняя оценка по шкале EDSS на момент введения Т-регуляторов составила  $2,58 \pm 1,31$  балла, а на +60-й день от достижения целевого показателя Т-регуляторов в периферической крови —  $2,0 \pm 0,86$  балла ( $p = 0,04$ ), что демонстрировало достоверную положительную динамику. Обострений в течение 7 мес после введения клеток зафиксировано не было.

Длительность эффективного периода действия клеток составляла в среднем  $7,2 \pm 1,45$  мес, что выражалось в стабильно высоком количестве Т-регуляторов при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. При снижении их

Таблица 3. Иммунофенотипирование крови детей с РС ( $n = 6$ ) до и после терапии аутологичными культивированными *ex vivo* Т-регуляторами

Показатель (%)	Фаза исследования		
	до введения Т-регуляторов	после введения Т-регуляторов	значимость различий ( $p$ )
$CD3^+$	$71,43 \pm 9,55$ [62,30; 84,60]	$68,34 \pm 7,47$ [56,30; 79,50]	0,57
$CD8^+$	$28,46 \pm 5,33$ [21,30; 39,40]	$21,35 \pm 4,96$ [15,40; 32,40]	0,006
$CD4^+$	$41,13 \pm 5,32$ [32,40; 58,30]	$42,34 \pm 7,87$ [28,30; 59,60]	0,36
$CD4^+/CD8^+$ (ИРИ)	$1,45 \pm 0,56$ [1,10; 2,50]	$1,93 \pm 0,42$ [1,60; 2,90]	0,01
$CD19^+$	$13,64 \pm 4,19$ [5,50; 19,30]	$9,76 \pm 4,55$ [4,50; 16,10]	0,01
$CD16^+CD56^+$	$20,1 \pm 6,54$ [7,56; 37,40]	$18,54 \pm 9,65$ [6,30; 35,50]	0,54
$CD4^+CD25^+FoxP3^+$	$2,1 \pm 1,25$ [1,80; 2,70]	$3,8 \pm 1,4$ [3,30; 4,60]	0,003

Таблица 4. Клиническая характеристика пациентов до и после терапии культивированными Т-регуляторами ( $n = 6$ )

Пациент	Возраст на момент включения в исследование (годы)	EDSS на момент введения Т-регуляторов (баллы)	EDSS после терапии (баллы)	Количество введений Т-регуляторов для достижения целевого уровня
Пациент № 1	17	2,0	1,0	1
Пациент № 2	16	2,0	1,5	1
Пациент № 3	9	3,5	3,0	1
Пациент № 4	14	1,0	1,0	2
Пациент № 5	17	4,0	3,5	1
Пациент № 6	16	3,0	2,0	1

количества или минимальной неврологической симптоматики решался вопрос о повторном введении аутологичных культивированных *ex vivo* Т-регуляторов.

#### Применение аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Ключевыми показателями эффективности ауто-ТГСК были определены стабилизация неврологической картины, отсутствие отрицательной динамики по данным МРТ, нормализация показателей субпуллярного состава лимфоцитов периферической крови и отсутствие выраженных осложнений.

Средний возраст пациентов, включенных в протокол, на момент ауто-ТГСК составил  $16 \pm 1,7$  года, длительность заболевания на момент включения в исследование —  $3,3 \pm 0,7$  года, что достоверно ( $p = 0,009$ ) больше, чем для пациентов, получивших клеточную терапию. Важно отметить, что всем пациентам проводилось лечение высокими дозами кортикостероидов и ВВИГ в периоды обострения, длительная терапия проводилась препаратами интерферон- $\beta_{1b}$  без выраженного эффекта. При стероид-рефрактерном течении заболевания дополнительно применялся плазмаферез ( $n = 3$ ), 2 пациентам выполнялась терапия митоксантроном с недостаточным положительным эффектом.

Для подтверждения тяжелого рефрактерного течения заболевания проводился анализ по следующим параметрам: оценка по шкале инвалидизации, длительность заболевания и длительность неуспешной терапии. Первым этапом был выполнен подсчет среднего показателя по шкале EDSS, который составил  $6,16 \pm 0,2$  (3,0–9,0) балла. Средняя длительность заболевания на момент включения в исследование составила  $28,8 \pm 13,38$  мес.

С целью оценки эффективности лечения была оценена своевременность начала высокодозной терапии. Для этого пациентов с ауто-ТГСК разделены на 2 группы согласно рекомендациям рабочей группы по лечению АЗ ЕВМТ [34]: группа 1 (своевременное начало высокодозной терапии) — больные, которым высокодозная терапия была инициирована в первые 6–12 мес

после определения рефрактерности течения заболевания; группа 2 (несвоевременное начало высокодозной терапии) — пациенты, которым высокодозная терапия была инициирована после 12 мес от определения рефрактерности течения заболевания.

Таким образом, в группу 1 вошли 4 пациента (пациенты № 2, 4, 6, 7), а в группу 2 — 5 пациентов. Был проведен анализ длительности иммуносупрессивной терапии от момента фиксации рефрактерности до момента начала кондиционирования. Для группы 1 этот интервал составил в среднем  $3,0 \pm 0,3$  мес, а для группы 2 —  $12,0 \pm 2,3$  мес; различие между группами статистически достоверно ( $p = 0,0007$ ).

Выполнен анализ различия результатов проведенной терапии в группах 1 и 2. При проведении терапии по протоколу у пациентов группы 1 отмечалось быстрое улучшение неврологического статуса уже в раннем посттрансплантационном периоде, что обусловлено, вероятно, действием ЦФ и атгама. Так, улучшение оценки по шкале EDSS в первые 60 дней в среднем составило  $2,5 \pm 0,21$  балла, при этом в последующий период — лишь  $0,2 \pm 0,02$  балла. Это подтверждает теорию о том, что значимый эффект ауто-ТГСК достигается благодаря действию иммуносупрессивных агентов, используемых при кондиционировании [35].

Максимальное улучшение оценки по шкале EDSS в исследуемой группе пациентов составило 5,5 балла, среднее значение —  $2,7 \pm 0,3$  балла. У пациентов № 4 и 6 (группа 1) отмечалось снижение EDSS до 1 балла с минимальными признаками проявлений РС. Динамика оценки по шкале EDSS в зависимости от времени наблюдения показана на рис. 3. Все пациенты наблюдаются в нашей больнице и других клиниках (для больных старше 18 лет). Период наблюдения на момент статистической обработки данных составил  $21,1 \pm 0,9$  мес (6–42 мес).

При исследовании было достоверно установлено, что у пациентов, терапия которых была начата вскоре после подтверждения диагноза, исход ТГСК был значимо лучше. Так, улучшение по шкале EDSS в группе 2 составило  $1,7 \pm 0,41$  балла, а в группе 1 —  $3,125 \pm 0,72$  бал-

Оценка по шкале EDSS (J. Jurtzke, 1983)

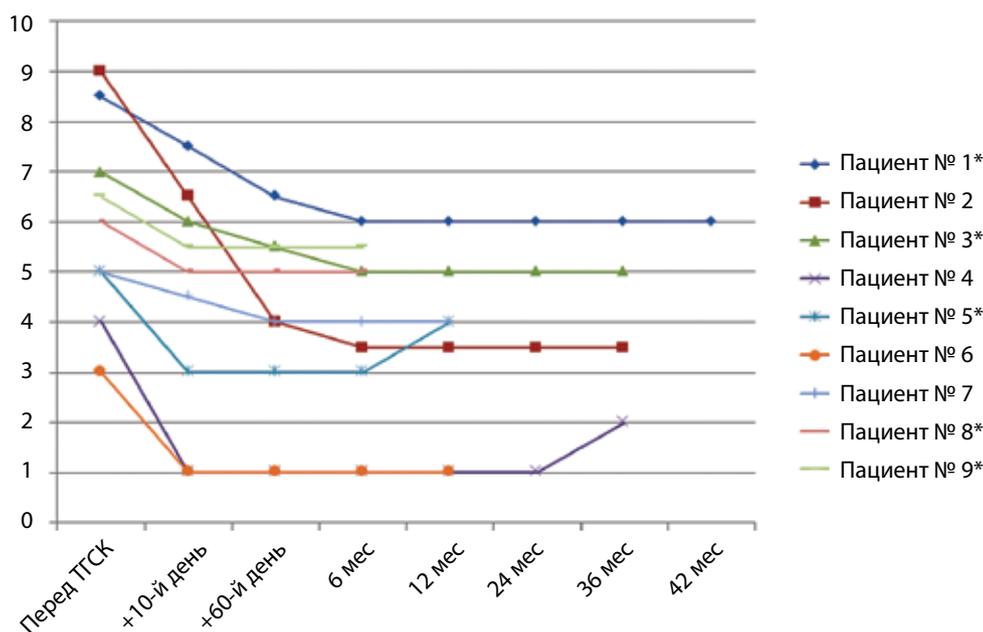


Рис. 3. Клиническая оценка динамики состояния пациентов по шкале EDSS в зависимости от времени наблюдения после ауто-ТГСК. Знаком \* отмечены пациенты группы 2

ла, при этом различия были статистически достоверны ( $p = 0,01$ ). Особо стоит отметить, что у пациентов № 6 и 7 начальная степень инвалидизации не была высокой, что обусловило сравнительно небольшое улучшение оценки по EDSS (табл. 5).

Таблица 5. Зависимость улучшения оценки по шкале EDSS и своевременности начала высокодозной иммуносупрессивной терапии

Группа 1		Группа 2	
пациент	улучшение по шкале EDSS (баллы)	пациент	улучшение по шкале EDSS (баллы)
№ 2	5,5	№ 1	2,5
№ 4	3	№ 3	2
№ 6	2	№ 5	2
№ 7	2	№ 8	1
		№ 9	1

При анализе гематологической и общесоматической составляющих протокола было показано, что у пациентов после ауто-ТГСК достаточно быстро фиксировалось приживление лейкоцитарного ростка (количество лейкоцитов выше 1,0 тыс/мкл), что отражено в табл. 6. В среднем приживление происходило через  $11,2 \pm 0,7$  дня, что сокращало период аплазии кроветворения и уменьшало риск возможных осложнений.

При этом осложнения проводимой терапии фиксировались в 66,7 % случаев (6 пациентов из 9), однако

они не носили жизнеугрожающий характер и были представлены фебрильной нейтропенией ( $n = 4$ ) и сывороточной болезнью ( $n = 2$ ). Данные осложнения были купированы усилением антибактериальной терапии и кратким курсом метилпреднизолона соответственно. Отдаленных осложнений проведенной терапии (иммунная тромбоцитопения и другие) зафиксировано не было.

Среднее число введенных в день 0 CD34-позитивных клеток составило  $(4,27 \pm 1,12) \times 10^6/\text{кг}$  ( $3,0 \times 10^6/\text{кг} - 5,0 \times 10^6/\text{кг}$ ), что соответствовало требованиям протокола.

В настоящий момент 7 (77,7 %) из 9 пациентов находятся в ремиссии. При этом повторные обострения (рецидивы) развивались в 2 случаях (у пациентов № 4 и 5). Данные больные относились к различным группам своевременности терапии, развитие обострения после ауто-ТГСК не было связано с клеточностью трансплантата либо другой погрешностью в осуществлении метода. Так, у пациента № 4 повторное обострение случилось лишь через 3 года после ауто-ТГСК на фоне стресса. До этого момента отмечались стабильные клиничко-рентгенологические показатели и данные субпопуляционного состава лимфоцитов крови, пациент не требовал поддерживающей терапии. У пациента № 5 повторное обострение случилось на фоне неудовлетворительных показателей иммунофенотипирования – значимое снижение ИРИ, нарастание количества CD8<sup>+</sup>-клеток.

Одним из наиболее важных аспектов в оценке эффективности проведенной терапии и прогноза по ос-

Таблица 6. Клиническая характеристика пациентов до и после ауто-ТГСК на ранних сроках ( $n = 9$ )

Пациент	Возраст на момент включения в исследование, годы	EDSS на момент включения в исследование	EDSS через 6 мес после ауто-ТГСК	Осложнения	День восстановления лейкопоза (> 1 тыс. лейкоцитов/мкл)
1	17	8,5	6,0	Фебрильная нейтропения	+11
2	17	9,0	3,5	—	+12
3	17	7,0	5,0	Фебрильная нейтропения	+10
4	16	4,0	1,0	—	+12
5	17	5,0	3,0	Фебрильная нейтропения	+10
6	16	3,0	1,0	Сывороточная болезнь	+11
7	15	5,0	3,0	—	+10
8	15	6,0	5,0	Сывороточная болезнь	+13
9	17	6,5	5,5	Фебрильная нейтропения	+12

новному заболеванию явилось изучение изменения показателей иммунофенотипирования до и после проведенной ауто-ТГСК.

Для подтверждения иммунологической эффективности лечения проводился анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. Так, было установлено, что статистически значимое увеличение ИРИ CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,009$ ) после проведения ауто-ТГСК соответствовало снижению аутоиммунной агрессии. При динамическом наблюдении данной группы пациентов ( $n = 9$ ) до и после ауто-ТГСК выявлено достоверное снижение количества CD8<sup>+</sup>-клеток ( $p = 0,004$ ) по сравнению с их количеством до трансплантации, что обуславливает изменение ИРИ у данных пациентов (табл. 7). Кроме того, в исследовании анализировалось содержание Т-регуляторов в периферической крови. До трансплантации Т-регуляторы составляли  $1,38 \pm 0,86\%$ , а после иммунореконституции — уже  $3,56 \pm 1,53\%$ , что указывает на достоверно значимое возрастание данной клеточной популяции ( $p = 0,0001$ ) (см. табл. 7).

Примером эффективности терапии служит демонстрация снимков МРТ пациента до и после ауто-ТГСК (рис. 4).

#### Обсуждение

При анализе статуса пациентов, получивших клеточную терапию, выявлено снижение количества эффекторных клеток, оказывающих деструктивное влияние на миелин, и благоприятное изменение ИРИ, характеризующееся его нормализацией. Подобные изменения наблюдались у пациентов и при анализе статуса в рамках обострения и вне его. Кроме того, было показано, что в ремиссии происходит увеличение числа Т-регуляторов, что было продемонстрировано и на взрослой популяции [6–8]. Увеличение количества Т-регуляторов в крови детей с РС на фоне клеточной терапии может быть связано с тем, что в дополнение к натуральным Т-регуляторам, образующимся в тимусе, прибавляются индуцированные на периферии Т-регуляторы. Эти клетки образуются из CD4<sup>+</sup> Т-клеток, пре-

Таблица 7. Иммунофенотипирование детей с РС до и после ауто-ТГСК

Показатель (%)	До ауто-ТГСК ( $n = 9$ )	После ауто-ТГСК ( $n = 9$ )	Значимость различий ( $p$ )
CD3 <sup>+</sup>	$73,32 \pm 8,32$ [64,80; 86,60]	$69,76 \pm 8,47$ [55,10; 77,40]	0,09
CD8 <sup>+</sup>	$30,87 \pm 6,28$ [23,70; 39,10]	$20,27 \pm 5,19$ [16,80; 31,70]	0,004
CD4 <sup>+</sup>	$35,47 \pm 4,65$ [33,20; 42,50]	$39,89 \pm 6,45$ [35,20; 45,50]	0,11
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (ИРИ)	$1,36 \pm 0,84$ [0,9; 2,40]	$2,2 \pm 0,53$ [1,90; 2,80]	0,009
CD19 <sup>+</sup>	$11,59 \pm 3,44$ [7,20; 19,70]	$10,23 \pm 3,27$ [5,90; 18,40]	0,46
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	$19,48 \pm 5,38$ [8,80; 27,90]	$20,69 \pm 8,95$ [10,28; 32,40]	0,32
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	$1,38 \pm 0,86$ [1,0; 1,80]	$3,56 \pm 1,53$ [2,90; 4,70]	0,0001

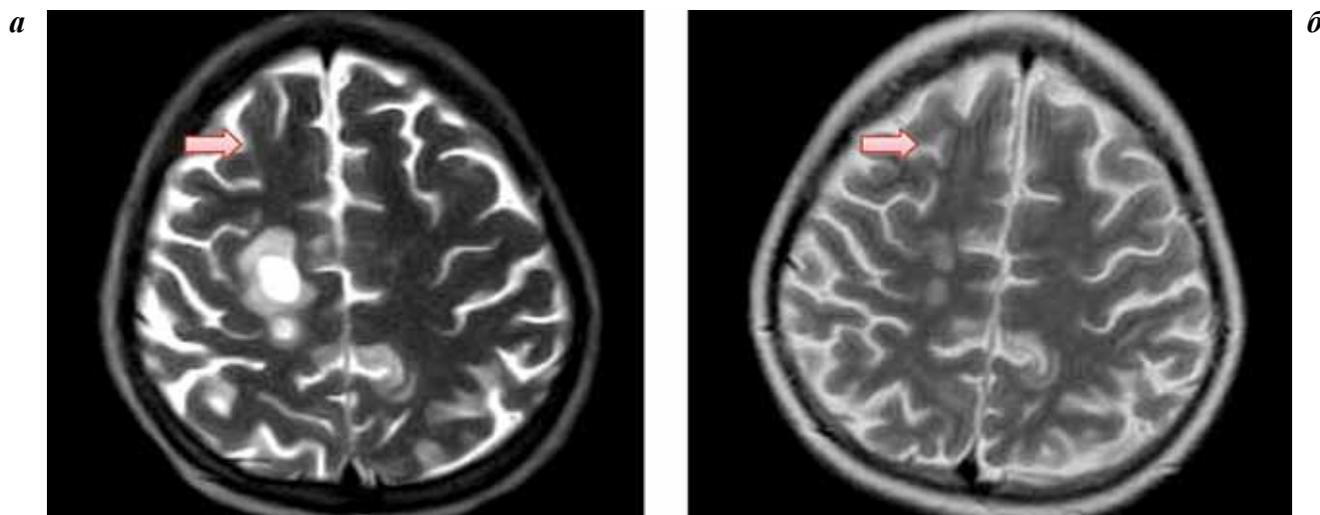


Рис. 4. Клинический пример. Изображения МРТ головного мозга ребенка 17 лет. Визуализируются множественные очаги демиелинизации, определяющиеся в T2-режиме до ауто-ТГСК (а) и их крайне выраженное сокращение на +45-й день (б)

мированных антигеном. Необходимым условием для появления индуцированных Т-регуляторов является присутствие трансформирующего фактора роста  $\beta$ . При этом индуцированные Т-регуляторы обладают такими же фенотипом и функциями, как и натуральные.

Благодаря возможности выделения и индукции *ex vivo* больших количеств долгоживущих неспецифичных неиммуногенных Т-регуляторов с высокой супрессорной активностью и позитивному опыту введения аутологичных Т-регуляторов взрослым с РС, данный метод успешно использован в качестве коррекции иммунных нарушений и у детей, страдающих РС. Безопасность и эффективность метода были показаны в данном исследовании — получено достоверное увеличение количества Т-регуляторов в крови детей с РС, что свидетельствует о миграции данных клеток в кровь, осложнений терапии выявлено не было. При этом важным клиническим аспектом является корреляция количества Т-регуляторов и компенсации неврологического дефицита по шкале EDSS. В работе была продемонстрирована зависимость увеличения уровня Т-регуляторных клеток и улучшения оценки по шкале EDSS.

В настоящее время остается нерешенным вопрос терапии рефрактерных форм данного заболевания, требующих новых подходов. Особенно важно, что ранее у детей не проводился анализ случаев рефрактерного течения РС и не были представлены способы курации данного состояния. Анализ полученных результатов является одним из первых шагов по систематизации подходов к данной проблеме и призван создать алгоритмы ведения рефрактерных форм РС у детей.

При абсолютно рефрактерном к 1-й и 2-й линиям терапии течения РС высокодозная терапия с использованием ЦФ и аттама с последующей ауто-ТГСК являлась эффективным методом купирования ауто-

иммунной воспалительной реакции. Данный метод терапии позволил добиться уменьшения поражения по шкале EDSS и положительных изменений при нейровизуализации.

В ряде случаев данная терапия являлась жизнеспасающей в связи с тем, что ЦФ способствует быстрому и эффективному купированию аутоиммунного воспаления. Зачастую эффект был виден на ранних сроках после начала терапии (мобилизация стволовых клеток и кондиционирование). Кроме того, в большинстве случаев данный метод являлся единственным эффективным.

Особо стоит отметить, что применение гемопоэтических стволовых клеток обусловлено необходимостью поддержки гемопоэза и скорейшего выхода из состояния аплазии кроветворения. Данное исследование показало, что лейкоцитарное приживление фиксируется на ранних сроках после ауто-ТГСК, что способствует значимому уменьшению числа возможных осложнений. Основной эффект при рефрактерном РС обусловлен действием иммуносупрессивных препаратов.

Одним из серьезных факторов успеха являлся длительный наблюдательный период с контролем заболевания по всем основным параметрам (клиническая картина, МРТ, данные лабораторных исследований), что строго закреплено протоколом. Данное взаимодействие основано на работе мультидисциплинарной команды, которая состоит из врачей-гематологов, неврологов, врачей лабораторной и лучевой диагностики.

Полученные при проведении ауто-ТГСК клинические данные подтверждались анализом результатов иммунофенотипирования пациентов, которое показало увеличение ИРИ после проведения трансплантации и нарастание количества Т-регуляторов. Обращает на себя внимание значимое снижение уровня Т-регуляторов на фоне рефрактерного аутоиммунного воспали-

тельного процесса. Причиной данного обстоятельства может быть повышенная продукция провоспалительных цитокинов активированными  $CD4^+$  Т-клетками, которые угнетают образование Т-регуляторов на периферии и повреждают уже существующие клетки. Помимо этого, может наблюдаться цитотоксическое действие  $CD8^+$  Т-клеток. В исследовательской работе выявлена корреляция балльной оценки по шкале EDSS и результатов иммунофенотипирования, что подтверждает теорию о «перезагрузке» иммунной системы после ауто-ТГСК.

Важнейшим фактором успеха является своевременность начала терапии, что подтверждается различной скоростью восстановления нарушенных неврологических функций у пациентов групп своевременного и позднего начала эффективной терапии.

#### Выводы по собственным данным

1. Введение культивированных *ex vivo* аутологичных Т-регуляторных клеток детям с РС позволило снизить инвалидизацию. Клиническая эффективность подтверждалась показателями субпопуляционного состава лимфоцитов крови – нормализация ИРИ, возрастание количества Т-регуляторов.

2. Высокодозная иммуноаблативная терапия (ЦФ и атгам) с последующей ауто-ТГСК является эффективным методом терапии рефрактерных форм РС у детей. Данный метод позволяет добиться стабилизации состояния и длительной ремиссии (6–42 мес) у 77,7 % больных. Нормализация иммунного статуса пациентов после ауто-ТГСК свидетельствует о явлении «перезагрузки» иммунной системы.

3. Определяющим фактором эффективности ауто-ТГСК у детей с РС является своевременность ее проведения, что заметно улучшает прогноз.

4. У пациентов с РС при обострении и после проведения ауто-ТГСК в периферической крови снижается количество Т-регуляторов. После обострения и при иммунореконституции после ауто-ТГСК данный по-

казатель увеличивается. Это указывает на то, что Т-регуляторы могут рассматриваться как маркер эффективности проводимой терапии.

5. Детям с рефрактерным течением РС показано раннее проведение высокодозной терапии ЦФ и атгамом с последующей ауто-ТГСК.

6. Для контроля эффективности терапии РС рекомендуется изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов как до, так и после терапии. При тенденции к снижению ИРИ и нарастанию количества цитотоксических Т-лимфоцитов необходимо принимать решение об эскалации проводимой терапии.

7. Лечение культивированными *ex vivo* Т-регуляторами рекомендуется в качестве превентивной терапии для пациентов с ремитирующим вариантом РС при возможности строгого соблюдения условий протокола и может применяться как альтернатива препаратам интерферона.

#### Системный склероз – вариант системного аутоиммунного заболевания

Системный склероз – заболевание, характеризующееся системным поражением кожи и висцеральных органов (сердце, легкие, желудочно-кишечный тракт, почки (рис. 5)) [36]. Без адекватной терапии 5-летняя выживаемость составляет не более 50 % [37]. В контексте лечения данного заболевания также активно применяются подходы, принятые в гематологии-онкологии. В лечении обострений применяются ГКС. Однако для длительного эффективного лечения необходимо применение цитостатиков. Возможным препаратом может быть ЦФ (оральный прием). Проведение ауто-ТГСК (ЦФ + атгам) при рефрактерных формах продлевает период ремиссии на более чем 2 года, о чем свидетельствует исследование EBMT ASTIS [38]. У детей системный склероз течет менее злокачественно, особенно на фоне применения ЦФ и ауто-ТГСК [39].

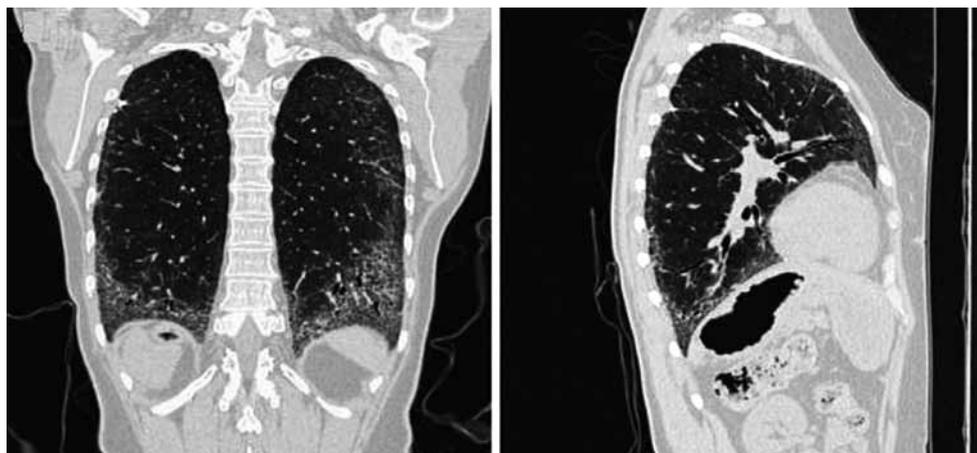


Рис. 5. Поражение легких при системном склерозе

### Заключение

АЗ требуют эффективного лечения для нивелирования аутоиммунной воспалительной реакции (терапия ГКС может рассматриваться как возможная опция курации пациентов с АЗ). Своевременно проведенная иммуносупрессивная терапия значительно улучшает исход заболевания. При применении иммуноаблатив-

ной терапии происходит «перезагрузка» иммунной системы, что потенциально защищает от последующих рецидивов основного заболевания.

Стратегия достижения успешного исхода: длительное наблюдение, взаимодействие между врачами различных специальностей; хороший контакт между детской и взрослой системами здравоохранения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Джесси Р. Аутоиммунные заболевания. М.: Книга по требованию, 2012. 104 с. [Jessey R. Autoimmune diseases. Moscow: Kniga po Trebovaniyu = Book upon Request, 2012. 104 p. (In Russ.).]
2. Бембеева Р.Ц. Рассеянный склероз у детей. Лечащий врач 2007;(7):6–51. [Bembeyeva R.C. Multiple sclerosis of children. Lechashchiy Vrach = Attending Physician 2007;(7):6–51. (In Russ.).]
3. Бойко А.Н., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Гусев Е.И. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза. В кн.: Рассеянный склероз. Под ред. Е.И. Гусева, И.А. Завалишина, А.Н. Бойко. М.: Реал Тайм, 2011. [Boyko A.N., Favorova O.O., Kulakova O.G., Gusev E.I. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. In: Multiple sclerosis. E.I. Gusev, I.A. Zavalishin, A.N. Boyko (eds.). Moscow: Real Time, 2011. (In Russ.).]
4. Selmi C. Hot topics in autoimmune diseases: perspectives from the 2013 Asian Congress of Autoimmunity. Autoimmun Rev 2014;13(8):781–7. doi: 10.1016/j.autrev.2014.05.006.
5. Mohyeddin Bonab M., Yazdanbakhsh S., Lotfi J. et al. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. Iran J Immunol 2007;4(1):50–7.
6. Елисеева Д.Д., Быковская С.Н., Завалишин И.А. Регуляторные Т-клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> при рассеянном склерозе. Нейроиммунология 2009;7(1):35–6. [Yeliseyeva D.D., Bykovskaya S.N., Zavalishin I.A. Regular T-cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> with multiple sclerosis. Neuroimmunologiya = Neuroimmunology 2009;7(1):35–6. (In Russ.).]
7. Елисеева Д.Д., Быковская С.Н., Завалишин И.А. Роль регуляторных Т-клеток в патогенезе рассеянного склероза. Медицина критических состояний 2010;(5):18–23. [Yeliseyeva D.D., Bykovskaya S.N., Zavalishin I.A. The role of regular T-cells in pathogenesis of multiple sclerosis. Meditsina kriticheskikh sostoyaniy = Medicine of Critical States 2010;(5):18–23. (In Russ.).]
8. Zhang L., Bertucci A.M., Ramsey-Goldman R. et al. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8<sup>+</sup> Treg cells are associated with immunological remission of lupus. J Immunol 2009;183(10):6346–58.
9. Завалишин И.А., Переседова А.В., Стойда Н.И. и др. Вопросы диагностики и лечения рассеянного склероза. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2011;111(6):88–95. [Zavalishin I.A., Peresedova A.V., Stoyda N.I. et al. Issues of diagnostics and treatment of multiple sclerosis. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatrics 2011;111(6):88–95. (In Russ.).]
10. Елисеева Д.Д., Завалишин И.А., Быковская С.Н. и др. Регуляторные Т-клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> у больных ремитирующим рассеянным склерозом. Анналы клинической и экспериментальной неврологии 2011;5(2):9–13. [Yeliseyeva D.D., Zavalishin I.A., Bykovskaya S.N. et al. Regular T-cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> of patients with remittance of multiple sclerosis. Annaly klinicheskoy i eksperimentalnoy nevrologii = Annals of Clinical and Experimental Neurology 2011;5(2):9–13. (In Russ.).]
11. Воробьев А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П. Роль клеток-регуляторов CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> в развитии хронических инфекционных заболеваний. Вестник РАМН 2006;(9–10):24–9. [Vorobyov A.A., Bykovskaya S.N., Pashkov E.P. Role of regulatory cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in development of chronic infectious diseases. RAMS Herald 2006;(9–10):24–9. (In Russ.).]
12. Schneider-Hohendorf T., Stenner M.P., Weidenfeller C. et al. Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. Eur J Immunol 2010;40(12):3581–590.
13. Скоробогатова Е.В., Балашов Д.Н., Трахтман П.Е. и др. Итоги двадцатилетнего опыта трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей. Педиатрия 2011;90(4):12–6. [Skorobogatova E.V., Balashov D.N., Trakhtman P.E. et al. Results of the 20-year experience of transplantation of hematopoietic stem cells of children. Pediatriya = Pediatrics 2011;90(4):12–6. (In Russ.).]
14. Burt R.K., Oyama Y., Traynor A. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis with rapid improvement in skin scores: is neoangiogenesis occurring? Bone Marrow Transplant 2003;32 Suppl 1: S65–7.
15. Бембеева Р.Ц. Ранняя диагностика и лечение рассеянного склероза в детской практике. Детская больница 2010;(4):62–8. [Bembeyeva R.C. Early Diagnostics and treatment of multiple sclerosis in pediatric practice. Detskaya Bolnitsa = Children's Hospital 2010;(4):62–8. (In Russ.).]
16. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2010. 272 с. [Schmidt T.E., Yakhno N.N. Multiple sclerosis: manual for physicians. 2<sup>nd</sup> edn. Moscow: MEDpress-Inform, 2010. 272 p. (In Russ.).]
17. Confraveux C., Aimard G., Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. Brain 1980;103(2):281–300.
18. Frohman E.M., Racke M.K., Raine C.S. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med 2006;354(9):942–55.
19. Tardieu M., Mikaeloff Y. Multiple sclerosis in children. Int MS J 2004;11(2):36–42.
20. Gadot N. Multiple sclerosis in children. Brain Dev 2003;25(4):229–32.
21. Milanetti F., Abinun M., Voltarelli J.C., Burt R.K. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for childhood autoimmune disease. Pediatr Clin North Am 2010;57(1):239–71.
22. Davidson A., Diamond B. Autoimmune disease. N Engl J Med 2001;345(5):340–50.
23. Riikonen R., von Willebrandt E. Lymphocytes subclasses and function in patients with optic neuritis in childhood with special reference to multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1988;78(1):58–64.
24. Balint B., Haas J., Schwarz A. et al. T-cell homeostasis in pediatric multiple sclerosis: old cells in young patients. Neurology 2013;81(9):784–92.
25. Bettini M., Vignali D.A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in

- autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009;21(6):608–12.
26. Makhani N., Gorman M.P., Branson H.M. et al. Cyclophosphamide therapy in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2009;72(24):2076–82.
27. Быкова О.В., Студеникин В.М., Кузенкова Л.М. и др. Опыт длительного эффективного лечения препаратом ребиф-22 рассеянного склероза у детей и подростков. *Журнал неврологии и психиатрии им С.С. Корсакова* 2006;3 (Спец. выпуск «Рассеянный склероз»): 116–21. [Vykova O.V., Studenikin V.M., Kuzenkova L.M. et al. Experience of long-term effective treatment of multiple sclerosis of children and adolescents with the Rebif-22 drug. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry* 2006;3(Spec Issue “Multiple Sclerosis”):116–21. (In Russ.)].
28. Cohen J.A., Barkhof F., Comi G. et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362(5):402–15.
29. Banwell B., Reder A.T., Krupp L. et al. Safety and tolerability of interferon beta-1b in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2006;66(4):472–6.
30. Guilhoto L.M., Osório C.A., Machado L.R. et al. Pediatric multiple sclerosis report of 14 cases. *Brain Dev* 1995;17(1):9–12.
31. Banwell B., Krupp L., Kennedy J. et al. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007;6(9):773–81.
32. Harding K., Liang K., Cossburn M. et al. Long-term outcome of paediatric-onset multiple sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84(2):141–7.
33. Шевченко Ю.Л., Новик А.А., Кузнецов А.И. и др. Аутологичная трансплантация кроветворных стволовых клеток при рассеянном склерозе: результаты исследования Российской кооперативной группы клеточной терапии. *Неврологический журнал* 2008;(2):34–8. [Shevchenko Yu.L., Novik A.A., Kuznetsov A.I. et al. Autological Transplantation of Hematopoietic Stem Cells with Multiple Sclerosis: Results of Research of the Russian Cooperative Group of Cell Therapy. *Nevrologicheskiy Zhurnal = Neurological Journal* 2008;(2):34–8. (In Russ.)].
34. Marjanovic Z., Snowden J., Badoglio M. et al. Long-term outcomes of autologous hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases: an extended analysis of the EBMT database 1996–2011. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:224–5.
35. Burt R.K., Loh Y., Cohen B. et al. Autologous non-myceloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol* 2009;8(3):244–53.
36. Diab S., Dostrovsky N., Hudson M. et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: a multicenter study of 1417 subjects. *J Rheumatol* 2014; 41(11):2179–85. doi: 10.3899/jrheum.140236.
37. Giuggioli D., Manfredi A., Colaci M. et al. Systemic sclerosis and cryoglobulinemia: our experience with overlapping syndrome of scleroderma and severe cryoglobulinemic vasculitis and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2013;12(11): 1058–63. doi: 10.1016/j.autrev.2013.06.013.
38. van Laar J.M., Farge D., Tyndall A. Autologous Stem cell Transplantation International Scleroderma (ASTIS) trial: hope on the horizon for patients with severe systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(10):1515.
39. Foeldvari I. New developments in juvenile systemic and localized scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2013;39(4):905–20. doi: 10.1016/j.rdc.2013.05.003.