

## РОЛЬ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТАНДАРТНОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Лазебник Л. Б.<sup>1</sup>, Болдырева О. Н.<sup>1</sup>, Парфенов А. И.<sup>2</sup>, Ручкина И. Н.<sup>2</sup>, Трубицына И. Е.<sup>2</sup>, Щербачев П. Л.<sup>2</sup>, Хомерики С. Г.<sup>2</sup>, Князев О. В.<sup>2</sup>, Сагынбаева В. Э.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО Московский Государственный Медико-Стоматологический Университет

<sup>2</sup> ГБУ ДЗМ Центральный Научно-Исследовательский Институт Гастроэнтерологии



### РЕЗЮМЕ

Одной из актуальных проблем современной гастроэнтерологии и колопроктологии является лечение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), к которым относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК). В последние годы большое внимание уделяется молекулам адгезии. Молекулы адгезии играют значительную роль в развитии воспаления при ВЗК. Они вызывают миграцию клеток из сосудистого русла в очаг воспаления, т.е. способствуют усилению воспалительной инфильтрации слизистой оболочки и хомингу лимфоцитов. Изменения уровней факторов адгезии под влиянием биологической терапии изучены недостаточно. В связи с этим целью нашего исследования было установить диагностическое значение молекул адгезии интегрин *sVCAM-1* и селектинов Р-, Е-, L- для оценки эффективности терапии ЯК и БК и прогноза течения заболевания у данной группы больных.

Было обследовано 15 больных ВЗК. Из них 15 больных болезнью Крона (БК). Из них 9 больных получивших инфликсимаб в дозе 5 мг/кг массы тела по стандартной схеме (0–2–6 и далее каждые 8 недель), 3 больных БК, которым проводилась комплексная противовоспалительная терапия с введением культуры МСК в количестве  $150 \times 10^8$  клеток, суспендированных в 200 мл физиологического раствора с добавлением гепарина (10 ЕД/мл) и 3 больных получали азатиоприн (2 мг/1 кг м.т.) и глюкокортикостероиды (ГКС) 1 мг/кг массы тела.

До и после лечения инфликсимабом, трансплантации МСК анализировали клинические симптомы, проводилось исследование уровня лейкоцитов, палочкоядерный сдвиг, СОЭ, СРБ, а также состояние слизистой оболочки кишечника с помощью колоноскопии с биопсией. В сыворотке крови определяли концентрацию молекул адгезии L- селектин, Е — селектин, Р- селектин, интегрин — *sVCAM-1* иммуноферментным методом дважды до начала терапии и через 2 месяца.

Установлено, что при стандартной терапии с использованием ГКС и АЗА у всех больных сохранялись клинические и лабораторные признаки активности ВЗК и увеличенные уровни содержания молекул адгезии. Под влиянием инфликсимаба у всех больных ВЗК отмечалось достоверно снижение уровней Р- селектина, Е-селектина до  $8,9 \pm 1,0$  нг/мл,  $5,5 \pm 1,7$  нг/мл и  $9,5 \pm 4,4$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ), что указывает на подавление синтеза основного цитокина воспаления  $\alpha$ -ФНО. Трансплантация МСК вызывает достоверное снижение Р- селектина, Е — селектина до  $6,9 \pm 1,1$  нг/мл и  $5,7 \pm 1,3$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ). Интегрин (*sVCAM-1*) снизился незначительно до  $12,2 \pm 2,2$  нг/мл,  $p > 0,1$ , что связано с наступлением максимального терапевтического эффекта после трансплантации только через 1–2 месяца. Уровни Р- селектина, Е-селектина, интегрин *sVCAM-1*, отражая острую фазу воспаления, снижались после трансплантации МСК и индукционной терапии ИНФ. Уровень L- селектина, являясь отражением хронического аутоиммунного воспаления, после трансплантации МСК ( $8,9 \pm 0,5$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) и индукционной терапии ИНФ ( $9,6 \pm 0,8$  нг/мл,  $p > 0,1$ ) практически не снижался, что предполагает назначение длительной терапии ИНФ и повторных трансплантаций МСК. Р- селектин, Е-селектин, L- селектин, интегрин — *sVCAM-1* являются современными маркерами воспаления, могут быть использованы для оценки эффективности стандартной и биологической терапии при ВЗК, и прогнозировать течение заболевания.

**Ключевые слова:** воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, азатиоприн, глюкокортикостероиды, инфликсимаб, мезенхимальные стромальные клетки, интегрины, селектины.

## SUMMARY

The treatment of inflammatory bowel diseases (IBD), which include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) is one of actual problems of modern gastroenterology and coloproctology. In recent years a great attention is paid to the molecules of adhesion. Adhesion proteins play a significant role in the development of inflammation in patients with IBD. They cause the migration of cells from the capillaries into the center of inflammation, i.e. do much to increase the inflammatory infiltration of the mucosa and homing of lymphocytes. Changes in the levels of adhesion factors under the influence of biological therapy have been insufficiently studied. So the aim of our study was to determine the diagnostic value of adhesion molecules — integrin-sVCAM-1 and selectins P-, E-, L- for the assessment of the effectiveness of therapy in patients with UC and CD and prognosis of the disease.

15 patients with IBD were examined (15 patients with Crohn's disease (CD)). 9 patients were treated using infliximab 5 mg/kg according to the standard scheme (0–2–6 and then every 8 weeks). 3 patients with IBD received anti-inflammatory therapy with the introduction of the culture of MSC in the number of  $150 \times 10^8$  cells suspended in 200 ml of physiological solution with the addition of heparin (10 IU/ml). 3 patients received azathioprine (2 mg/kg) and glucocorticosteroids (GCS) 1 mg/kg.

The clinical symptoms, the level of leukocytes, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein and also were analyzed before and after the treatment with infliximab and transplantation of MSC. The status of the colonic mucosa was evaluated using colonoscopy with biopsy. The concentration of adhesion molecules L-selectin, E-selectin, P-selectin, integrin-sVCAM-1 in blood serum was analyzed using immunoenzyme method twice before the beginning of treatment and after 2 months.

It is established that after the standard therapy with the use of corticosteroids and azathioprine clinical and laboratory signs of IBD activity and increased levels of adhesion molecules remained in all patients. It is reliably determined that under the influence of infliximab the levels of P-selectin, E-selectin and integrin-sVCAM-1 decrease to  $8.9 \pm 1.0$  ng/ml,  $5.5 \pm 1.7$  ng/ml,  $9.5 \pm 4.4$  ng/ml, respectively ( $p < 0.001$ ) in all patients with IBD. This points to the suppression of the synthesis of the main inflammatory cytokine  $\alpha$ -TNF. Transplantation of MSC causes significant decrease of P-selectin, E-selectin to  $6.9 \pm 1.1$  ng/ml and  $5.7 \pm 1.3$  ng/ml, respectively ( $p < 0.001$ ). Integrin-sVCAM-1 has decreased slightly to  $12.2 \pm 2.2$  ng/ml,  $p > 0.1$ . This is associated with the onset of the maximum therapeutic effect only in 1–2 months after transplantation.

The levels of P-selectin, E-selectin, integrin-sVCAM-1, reflecting the acute phase of inflammation, decreased after MSC transplantation and infliximab induction therapy. The level of L-selectin, reflecting a chronic autoimmune inflammation, practically does not decrease after the MSC transplantation ( $8.9 \pm 0.5$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) and infliximab induction therapy ( $9.6 \pm 0.8$  ng/ml,  $p > 0.1$ ). These include the appointment of long-term infliximab therapy and repeated MSC transplantations. P-selectin, E-selectin, L-selectin, integrin-sVCAM-1 are modern markers of inflammation and may be used to assess the effectiveness of standard and biological therapy in patients with IBD, and to predict the course of the disease.

**Keywords:** inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, azathioprine, corticosteroids, infliximab, mesenchymal stem cells, integrins, selectins.



Баррил Бернард Крон

## БОЛЕЗНЬ КРОНА

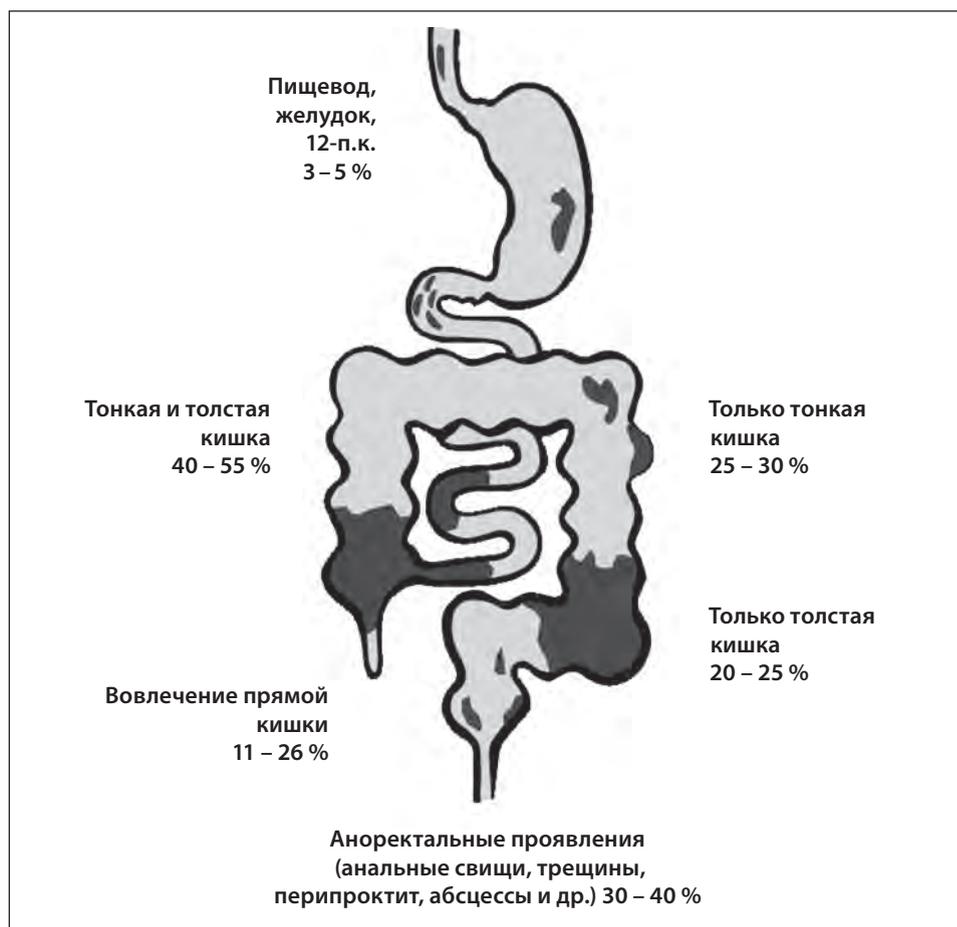
Статус отдельного заболевания терминальный илеит приобрёл в 1932 году, когда врач В. Crohn (Баррил Бернард) описал более 10 достоверных случаев этой болезни.

## БОЛЕЗНЬ КРОНА (гранулематозное воспаление)

Болезнь Крона — хроническое рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта неясной этиологии, характеризующееся трансмуральным сегментарным воспалением в различных отделах ЖКТ с развитием местных и системных осложнений. [1,2,11].

## ИММУНОПАТОГЕНЕЗ БК

В настоящее время болезнь Крона считается аутоиммунным заболеванием, однако точная причина остается неизвестной. В качестве альтернативных гипотез рассматриваются выявление мутации в гене NOD2/CARD15. [3, 5, 12].



Распространенность поражения при болезни Крона

## ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ КРОНА

При анализе распространенности болезни Крона чаще всего встречается поражение илеоцекальной области, которая клинически может протекать по типу острого аппендицита, что нередко может приводить к оперативному вмешательству, тогда диагностика проводится в послеоперационном материале. При локализации болезни Крона в других отделах ЖКТ характерными клиническими симптомами являются: болевой синдром, диспепсический, лихорадка до фебрильных цифр. В клиническом анализе крови появляются признаки воспалительных изменений (лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом, повышение СОЭ, СРБ, развитие анемии железодефицитной или смешанной этиологии). При поражении болезни Крона тонкой кишки может развиваться синдром нарушенного всасывания с нарушением всех видов обмена веществ: гипопроteinемия, электролитные нарушения. В клиническом анализе кала выявляется положительная реакция на скрытую кровь. В последние годы в диагностике ВЗК с успехом используется кальпротектин (менее 50–120 мкг/г) который отражает выраженность воспаления в кишечнике. «Золотым» стандартом диагностики болезни Крона является эндоскопический метод (колонофиброскопия с осмотром подвздошной кишки, глубокая интестиноскопия, двухбаллонная эндоскопия позволяющая выявить протяженность поражения,

степень выраженности воспаления). Для исключения распространенной формы поражения тонкого кишечника при болезни Крона с успехом используется видеокапсульная эндоскопия. По литературным данным морфологическое исследование биоптатов тонкой и толстой кишки только в 10–15% случаях позволяет выявить патогенетические признаки заболевания. Характерная особенность болезни — формирование неказеозных саркоидоподобных эпителиоидных гранул с клетками Пирогова — Ланханса. Гранулемы находят приблизительно в 30–40% при гистологическом исследовании биопсийного материала. При исследовании операционного материала гранулемы обнаруживаются гораздо чаще, в том числе и в лимфатических узлах брыжейки. Присутствие гранул патогномично для болезни Крона, но их отсутствие не дает оснований для ее исключения. Гистологическое исследование позволяет видеть выраженную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы лимфоидными клетками, толстостенные сосуды с явлениями васкулита [4,10,12]. Рентгенологические методы исследования (ирригоскопия, рентгенография тонкой кишки) также позволяет выявить БК особенно ее осложненной формы (кишечные свищи, стеноз, воспалительную инфильтрацию). Возможно использование КТ с контрастированием кишечника.

Используется УЗИ исследование для диагностики ВЗК. Несмотря на многочисленные методы диагностики БК в ряде случаев возникают трудности для своевременного выявления ранних форм БК. В этих случаях используются иммунологические методы диагностики — определение уровней цитокинов, иммуноглобулинов, ASCA (*accharomyces cerevisiae* — одноклеточные грибы, широко известные как «печкарские дрожжи»). АТ к *Saccharomyces cerevisiae* класса IgG и IgA направлены против олигоманнанового эпитопа маннана (фосфопептидоман-нана) клеточной мембраны дрожжей. АТ класса IgG и IgA к *Saccharomyces cerevisiae* тесно связаны с болезнью Крона и обладают специфичностью 95–100%. АТ класса IgG к *Saccharomyces cerevisiae* выявляют только у 5% больных язвенным колитом а АТ IgA — у 7%. Диагностическая чувствительность определения АТ класса IgG для диагностики болезни Крона составляет 75%, для IgA — 60%. В последние годы для диагностики БК используются молекулы адгезии [6, 8, 16].

### МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ — МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

Установлено, что в развитии воспаления при ВЗК основную роль играет нарушение врожденного иммунного ответа. В развитии воспаления ведущая роль принадлежит противовоспалительным цитокинам: среди которых: фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкины (ИЛ): ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, эйкозаноиды, метаболиты кислорода (свободные радикалы) и NO [3,7,12].

Молекулы адгезии (интегрин (sVCAM-1) и селектинов (P-, E-, L-) также играют важную роль в развитии воспаления при ВЗК. С их помощью происходит миграция лейкоцитов в очаг воспаления и образуется воспалительный инфильтрат:

1. адгезия (прилипание) к эндотелию сосудов в очаге воспаления;
2. проникновение через эпителий;
3. перемещение в направлении очага воспаления под влиянием хемотаксиса (S. S. *Pierangeli et al., 2009*).

В настоящее время идентифицированы основные семейства молекул адгезии: интегрин — гетеродимерные молекулы, функционирующие как

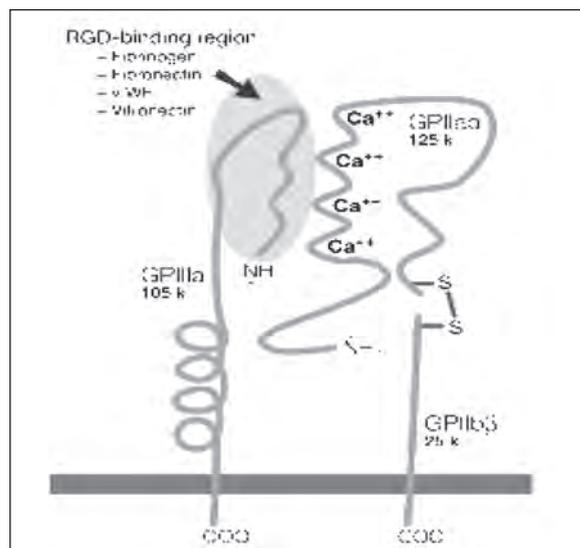


Рис.1. Схема строения молекулы интегрина.

клеточно-субстратные, так и как межклеточные адгезивные рецепторы (Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. *Cell Tissue Res.*, 2010). Имеется 3 семейства интегрин. К наиболее важным для миграции клеток относится — интегрин sVCAM — 1. Провоспалительные цитокины, особенно  $\alpha$ -ФНО, интерлейкины 1,6,12 стимулируют выработку интегрин (sVCAM-1) из лейкоцитов и способствуют его миграции в очаг воспаления [13, 14, 15].

Селектины — адгезивные молекулы, лектиноподобный домен которых обеспечивает адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам (Bevilacqua M., *Annu. Rev. Immunol.*, 2008).

**Цель исследования:** установить диагностическое значение уровня молекул адгезии: интегрин (sVCAM-1) и селектинов (P-, E-, L-) для оценки эффективности стандартной и биологической терапии при болезни Крона.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 15 больных с болезнью Крона (БК). Средняя длительность заболевания составила от 5,5 ± 3,4 лет. Возраст больных составил от 20 до 58 лет, средний возраст - 35,6 ± 3,0 (M ±  $\sigma$ ). Динамика клинических

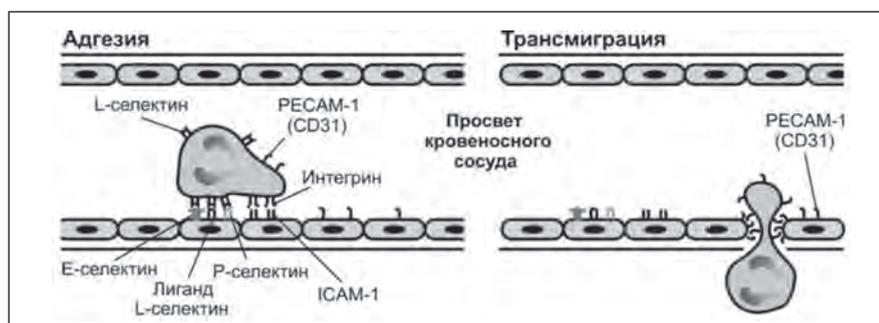


Рис.2. P-селектин на поверхности эндотелиальной клетки и тромбоцита.

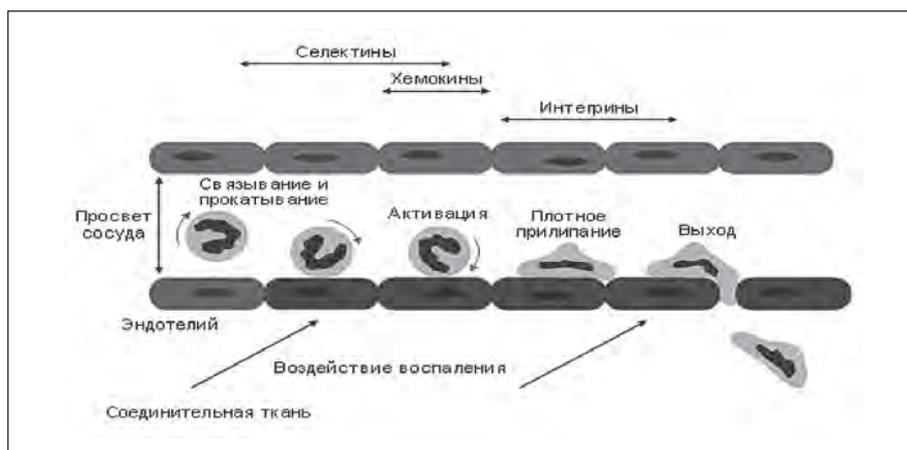


Рис.3. Активированные эндотелиоциты секретируют и выводят селектины.

симптомов, лабораторных показателей оценивалась в течение 2 месяцев от начала терапии. Все больные в зависимости от терапии разделены на 3 группы:

1 группа: 3 больных с БК. У всех больных отмечалось хроническое гормонозависимое течение заболевания. Для преодоления гормонозависимости больные длительно получали азатиоприн 2 мг/1 кг веса, однако ремиссию заболевания достичь не удавалось, больные продолжали терапию ГКС из расчета 1 мг/1 кг веса.

2 группа: 9 больных с БК. В связи с тяжелым течением заболевания помимо ГКС из расчета 1 мг/1 кг веса и азатиоприна 2 мг/1 кг веса. Для преодоления гормонозависимости - больные получали инфликсимаб в дозе 5 мг/кг массы тела по стандартной схеме (0–2–6 и далее каждые 8 недель).

3 группа: 3 больных с БК. Помимо ГКС из расчета 1 мг/1 кг веса Для преодоления гормонозависимости проводилась трансплантация мезенхимальных стволовых клеток  $150 \times 10^8$  клеток, суспендированных в 200 мл физиологического раствора с добавлением гепарина (10 ЕД/мл). Больным данной группы за 2–3 дня до введения МСК отменяли иммуносупрессоры (азатиоприн), снижали дозу кортикостероидов до 15–20 мг/сут, которую постепенно снижали до полной отмены (при отсутствии рецидива заболевания) в течение 6–8 недель, дозу аминосалицилатов оставляли на уровне 2,0 г/сут.

У всех больных оценивались клинические симптомы, определялись воспалительные изменения в клиническом анализе крови (лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг, СОЭ), СРБ, а также проводилось эндоскопическое исследование кишечника с биопсией. Иммуноферментным методом в сыворотке крови определялся уровень молекул адгезии (L-селектин, E — селектин, P- селектин, интегрин — sVCAM-1) до начала терапии и через 2 месяца после.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ КРОНА ЧЕРЕЗ 2 МЕСЯЦА ОТ НАЧАЛА ТЕРАПИИ

В 1 группе у 3 больных с БК несмотря на прием азатиоприна и ГКС значительного улучшения

клинических симптомов не отмечено: сохранялась диарея с примесью крови в стуле до 2–3 раз в сутки, боли в животе в проекции ободочной кишки, сохранялась лихорадка в вечернее время до 37,2–37,5 гр., прибавка в весе незначительная до 2–3 кг. В клинических анализах крови сохранялись длительное время: ускоренное СОЭ  $13 \pm 6,13$ , мм/час, лейкоцитоз  $8,93 \pm 1,21$  тыс., СРБ  $15,02 \pm 7,87$  мг/л. палочкоядерный сдвиг снизился с  $9,89 \pm 2,38\%$  до  $3,78 \pm 1,14\%$ . При эндоскопическом исследовании у больных с БК с поражением СОТК получавших стандартную терапию в течение 2 месяцев сохранялась активность воспаления в слизистой оболочке толстой кишки. CDAI составил:  $280 \pm 80$  баллов.

В сыворотке крови уровень молекул адгезии после стандартной терапии сохранялся повышенным sE — селектин  $11,4 \pm 2,5$  нг/мл ( $p=0,35$ ), sL- селектин  $9,2 \pm 1,8$  нг/мл ( $p=0,01$ ), sVCAM-1  $28,2 \pm 5,3$  нг/мл ( $p=0,7$ ). Незначительно снизился уровень sP- селектин до  $6,6 \pm 1,4$  нг/мл ( $p<0,01$ ).

Во 2 группе 9 больных с БК, получивших инфликсимаб. Клинически у больных на фоне терапии инфликсимабом достигнута положительная динамика: стул стал оформленный 2 раза в сутки, исчезла примесь крови в стуле, боли в животе купировались, температура тела нормализовалась, больные прибавили в весе 4–6 кг. На фоне продолжающейся терапии инфликсимаба по схеме 0–2–6-и далее каждые 8 недель всем больным успешно снижалась доза ГКС на 5 мг через каждые 5–7 дней. В клинических анализах крови исчезли воспалительные изменения: лейкоциты снизились с  $10 \pm 1,03$  до  $6,68 \pm 0,71$ , СОЭ с  $35,43 \pm 7,30$  мм/час до  $17,86 \pm 3,16$  мм/час, исчез палочкоядерный сдвиг с  $5,30 \pm 0,78\%$  до  $1,73 \pm 0,29\%$ , СРБ снизился до нормальных показателей с  $13,89 \pm 2,58$  мг/л до  $4,33 \pm 0,86$  мг/л. CDAI  $200 \pm 40$  баллов.

Достоверно снизилась концентрация молекул адгезии: sP- селектин, sE — селектин, sVCAM-1 до  $8,9 \pm 1,0$  нг/мл,  $5,5 \pm 1,7$  нг/мл и  $9,5 \pm 4,4$  нг/мл соответственно ( $p<0,001$ ). Однако уровень

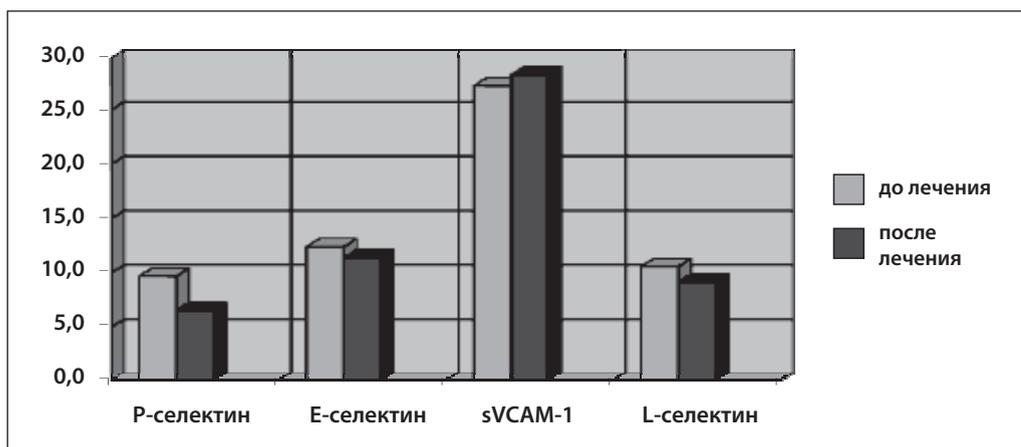


Рис. 4. Динамика показателей молекул адгезии у б-х болезнью Крона до и после лечения ГКС+АЗА.

sL- селектина после терапии инфликсимабом в сыворотке крови составил  $9,6 \pm 0,8$  нг/мл ( $p > 0,1$ ), не достигая нормы.

При эндоскопическом исследовании после 2 месяцев терапии инфликсимабом у больных с болезнью Крона толстой кишки отмечалось уменьшение воспалительных изменений слизистой оболочки кишечника (СОТК).

Болезнь Крона в области слепой кишки видно кровотечение из линейной язвы гиперплазированной складки псевдополипа.

Болезнь Крона в области поперечно-ободочной кишки на фоне отсутствующего сосудистого рисунка определяются неправильной формы глубокие язвы перемежающиеся с участками неизменной слизистой оболочки, контактная кровоточивость.

Болезнь Крона стадия 1–2 области нисходящего отдела в сигмовидную кишку: на стенках видны афты, смазанность сосудистого рисунка.

### ПРИ МОРФОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ БИОПТАТОВ СОТК

В 3 группе 3 больных с БК получавших культуру мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК) отмечалось постепенное развитие клинической ремиссии: стул оформленный 1–2 раза, исчезла примесь крови в стуле, боли в животе купировались, температура тела нормализовалась, прибавка в весе 3–5 кг. В клиническом анализе крови: острофазные воспалительные белки (лейкоциты снизились с  $12,76 \pm 1,24$  тыс. до  $6,98 \pm 0,92$ , СОЭ с  $27,9 \pm 8,80$  мм/час до  $5,63 \pm 1,34$  мм/час, исчез палочкоядерный сдвиг  $9,60 \pm 1,17\%$  до  $2,55 \pm 0,68\%$ , СРБ снизился до нормальных показателей с  $20,77 \pm 8,40$  мг/л до  $3,69 \pm 0,81$  мг/л). CDAI  $150 \pm 30$  баллов.

При эндоскопическом исследовании после 2 месяцев трансплантации MSC у больных с болезнью Крона толстой кишки отмечалось уменьшение воспалительных изменений слизистой оболочки кишечника (СОТК).

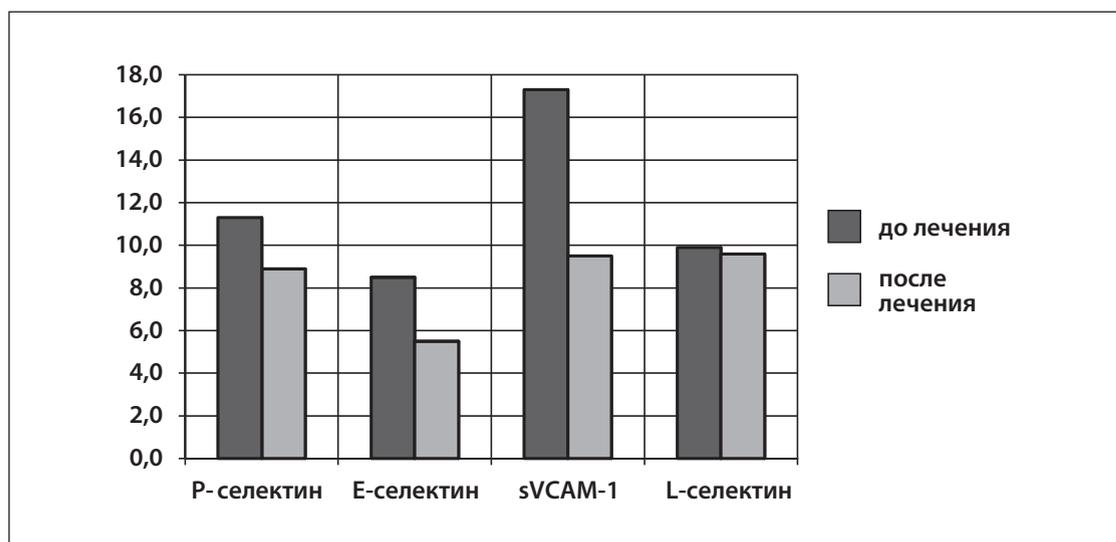


Рис. 5. Динамика показателей молекул адгезии у б-х с болезнью Крона после индукционного курса инфликсимаба\*.

\* Рис. 6, 7, 9 — на цветной вклейке в журнал.

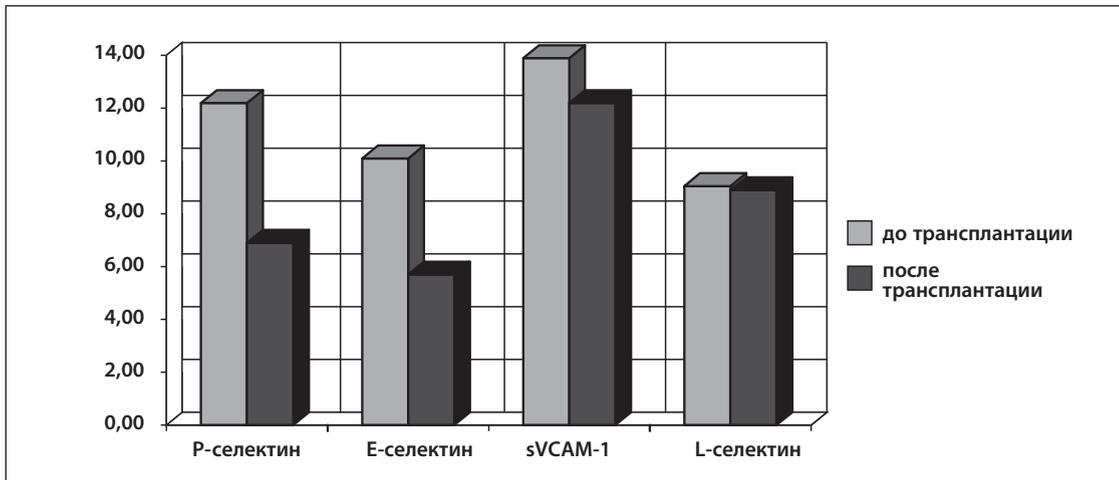


Рис. 8. Динамика показателей молекул адгезии у б-х болезнью Крона до и после трансплантации МСК.

### ПРИ МОРФОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ БИОПТАТОВ СОТК

При трансплантации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) у больных с БК получены следующие результаты: МСК достоверно снижают уровень P- селектина с  $12,2 \pm 1,8$  до  $6,9 \pm 1,1$  нг/мл ( $p < 0,001$ ); E — селектина с  $10,1 \pm 3,3$  до  $5,7 \pm 1,3$  нг/мл ( $p < 0,001$ ); незначительно снижают интегрин — sVCAM-1 с  $13,9 \pm 4,4$  до  $12,2 \pm 2,2$  нг/мл ( $p > 0,1$ ); концентрация L- селектина практически не изменялась с  $9,05 \pm 0,5$  до  $8,9 \pm 0,5$  нг/мл ( $p < 0,05$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, при стандартной терапии (ГКС+А3А) у всех больных клинически сохранялись боли в животе в проекции поперечно-ободочной и сигмовидной кишки, диарея с примесью крови в стуле до 2–3 раз в сутки, лихорадка в вечернее время до  $37,2$ – $37,5$  гр., прибавка в весе незначительная до 2–3 кг. В клинических анализах крови сохранялись длительное время: ускоренное СОЭ  $13 \pm 6,13$ , мм/час, лейкоцитоз  $8,93 \pm 1,21$  тыс., СРБ  $15,02 \pm 7,87$  мг/л. В сыворотке крови уровень молекул адгезии после стандартной терапии сохранялся повышенным sE — селектин  $11,4 \pm 2,5$  нг/мл ( $p = 0,35$ ), sL- селектина  $9,2 \pm 1,8$  нг/мл ( $p = 0,01$ ), sVCAM-1  $28,2 \pm 5,3$  нг/мл ( $p = 0,7$ ). Незначительно снизился уровень sP- селектин до  $6,6 \pm 1,4$  нг/мл ( $p < 0,01$ ).

При эндоскопическом исследовании у больных с БК с поражением СОТК получавших стандартную терапию в течение 2 месяцев сохранялась активность воспаления в слизистой оболочке толстой кишки. CDAI составил:  $280 \pm 80$  баллов.

При морфологическом исследовании сохранялась воспалительная инфильтрация собственной пластинки, лейкоцитарная инфильтрация в подслизистом слое.

Во 2 группе больных БК получавших инфликсимаб клинически достигнута положительная динамика: стул стал оформленный 2 раза в сутки, исчезла примесь крови в стуле, боли в животе купировались, температура тела нормализовалась, больные прибавили

в весе 4–6 кг. На фоне продолжающейся терапии инфликсимаба по схеме 0–2–6 и далее каждые 8 недель всем больным успешно снижалась доза ГКС на 5 мг через каждые 5–7 дней. В клинических анализах крови исчезли воспалительные изменения: лейкоциты снизились с  $10 \pm 1,03$  до  $6,68 \pm 0,71$ , СОЭ с  $35,43 \pm 7,30$  мм/час до  $17,86 \pm 3,16$  мм/час, исчез палочкоядерный сдвиг с  $5,30 \pm 0,78\%$  до  $1,73 \pm 0,29\%$ , СРБ снизился до нормальных показателей с  $13,89 \pm 2,58$  мг/л до  $4,33 \pm 0,86$  мг/л. CDAI  $200 \pm 40$  баллов.

Достоверно снизилась концентрация молекул адгезии: sP- селектин, sE — селектин, sVCAM-1 до  $8,9 \pm 1,0$  нг/мл,  $5,5 \pm 1,7$  нг/мл и  $9,5 \pm 4,4$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ). Однако уровень sL- селектина после терапии инфликсимабом в сыворотке крови составил  $9,6 \pm 0,8$  нг/мл ( $p > 0,1$ ), не достигая нормы.

При эндоскопическом исследовании после 2 месяцев терапии инфликсимабом у больных с болезнью Крона толстой кишки отмечалось уменьшение воспалительных изменений слизистой оболочки кишечника (СОТК).

При морфологическом исследовании уменьшение воспалительной инфильтрации собственной пластинки. Положительная динамика: лейкоцитарная инфильтрация в подслизистом слое.

В 3 группе 3 больных с БК получавших культуру мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК) отмечалось постепенное развитие клинической ремиссии: стул оформленный 1–2 раза, исчезла примесь крови в стуле, боли в животе купировались, температура тела нормализовалась, прибавка в весе 3–5 кг. В клиническом анализе крови: острофазные воспалительные белки (лейкоциты снизились с  $12,76 \pm 1,24$  тыс. до  $6,98 \pm 0,92$ , СОЭ с  $27,9 \pm 8,80$  мм/час до  $5,63 \pm 1,34$  мм/час, исчез палочкоядерный сдвиг  $9,60 \pm 1,17\%$  до  $2,55 \pm 0,68\%$ , СРБ снизился до нормальных показателей с  $20,77 \pm 8,40$  мг/л до  $3,69 \pm 0,81$  мг/л). CDAI  $150 \pm 30$  баллов. В сыворотке крови после трансплантации МСК достоверно снижается уровень P- селектина с  $12,2 \pm 1,8$  до  $6,9 \pm 1,1$  нг/мл ( $p < 0,001$ ); E — селектина с  $10,1 \pm 3,3$  до  $5,7 \pm 1,3$  нг/мл ( $p < 0,001$ ); незначительно снижают интегрин — sVCAM-1 с  $13,9 \pm 4,4$  до  $12,2 \pm 2,2$

нг/мл ( $p > 0,1$ ); концентрация L- селектина практически не изменялась с  $9,05 \pm 0,5$  до  $8,9 \pm 0,5$  нг/мл ( $p < 0,05$ ).

При эндоскопическом исследовании после 2 месяцев трансплантации МСК у больных с болезнью Крона толстой кишки отмечалось уменьшение воспалительных изменений слизистой оболочки кишечника (СОТК).

При морфологическом исследовании через 2 месяца после трансплантации МСК. Крипты обычной глубины. Эпителиальная выстилка крипт содержит большое количество бокаловидных клеток. Собственная пластинка слабо инфильтрирована лимфоцитами и плазмочитами. Крипты обычной конфигурации. Отмечается гиперплазия бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке крипт.

В результате проведенного исследования выявлено, что после стандартной терапии уровень молекул адгезии сохранялся повышенным sE — селектин, sL- селектин, sVCAM-1, незначительно снизился уровень sP- селектина. После индукционной терапии инфликсимабом достоверно снижается уровень P-селектина, E-селектина, интегрина — sVCAM-1, т.к. они характерны для острой фазы воспаления слизистой оболочки кишечника, а концентрация уровня L-селектина незначительно снижается у больных воспалительными заболеваниями кишечника, т.к. данный показатель отражает хроническое воспаление слизистой оболочки кишечника. При трансплантации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) у больных ВЗК получены следующие результаты: МСК достоверно снижают уровень P-селектина, E- селектина, незначительно снижают интегрин — sVCAM-1, концентрация L- селектина практически не изменялась. Исследование проводилось в первые дни после трансплантации МСК. L- селектин снижался в более поздние сроки, т.к. отражает хроническое воспаление и требует назначения длительной биологической терапии, как антицитокиновой, так и проведение трансплантации МСК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит, М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.
2. Белоусова Е. А. Терапия воспалительных заболеваний кишечника: настоящее и будущее // Врач. — 2002. — № 2: 36–39.
3. Белоусова Е. А. Язвенный колит и болезнь Крона. — Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2002.
4. Водилова О. В., Мазанкова Л. Н., Халиф И. Л. // Болезни кишечника. Клинические варианты болезни Крона в детском возрасте. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2005. — № 4.
5. Григорьева Г. А., Мешалкина Н. Ю. Болезнь Крона. — М.: Медицина, 2007.
6. Калинин А. В., Хазанов А. И. «Гастроэнтерология и гепатология». — М.: Миклош, 2006: 602.
7. Мешкова Р. Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей// НИИХ СГМА, 2000–2007: 1–46.
8. Парфенов А. И. «Энтерология». — М.: Триада-Х, 2009: 744.
9. Плейфайер Дж. Х. Л., Чейн Б. М. «Наглядная иммунология» // М., 2008: 25–119.
10. Ройт, А., Дж. Бростовф, Д. Мейл. «Иммунология» / М., 2000: 169–175.
11. Румянцев В. Г., Щиголева Н. Е. Болезнь Крона в детском возрасте Consilium medicum. Журнал доказательной медицины для практикующих врачей. — 2002.
12. Ткач С. М. «Эволюция взглядов на лечение воспалительных заболеваний кишечника. НМУ им. А. А. Богомольца г. Киев. 2008.
13. Халиф И. Л., Лоранская И. Д. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона): клиника, диагностика и лечение. — М.: Миклош, 2004.
14. Cybulsky M. I., Iiyama K., Li H, Zhu S, Chen M, et al. A major role for VCAM- 1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J. Clin Invest 2001; 107:1255–1262.
15. Arao S, Masumoto A, Otsuki M. «Beta 1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. Pancreas». 2000; 20: 129–137.
16. Borsig L., Wong R., Hynes R. O, Varki NM, Varki A: Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. PNAS 2002; 99: 2193–2198.
17. Goggins MG, Goh J, O'Connell MA, Weir DG, Kelleher D, Mahmud N. Soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Ir. J. Med. Sci. 2001; 179: 107–111.

## ВЫВОДЫ

1. При стандартной терапии у всех больных с БК сохранялись воспалительные изменения в крови и высокие уровни молекул адгезии. Клинически в этой группе сохранялись признаки активности заболевания.

2. Под влиянием инфликсимаба у всех больных с БК отмечалось достоверно снижение уровней P- селектина, E-селектина, sVCAM –1 до  $8,9 \pm 1,0$  нг/мл,  $5,5 \pm 1,7$  нг/мл и  $9,5 \pm 4,4$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ), что является отражением уменьшения процессов воспаления в слизистой оболочке кишечника при БК, а также обусловлено механизмом действия препарата (подавление синтеза основного цитокина воспаления ФНО-  $\alpha$ ).

3. В группе больных после трансплантации МСК показатели P- селектина, E — селектина достоверно снизились до  $6,9 \pm 1,1$  нг/мл,  $5,7 \pm 1,3$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ). Интегрин — sVCAM-1 снизился незначительно до  $12,2 \pm 2,2$  нг/мл,  $p > 0,1$ ), в связи с тем, что максимальный положительный эффект от МСК развивается через 1–2 месяца, что нашло отражение в динамике клинических симптомов, эндоскопической картины, снижение уровня воспаления в биоптатах СОТК при болезни Крона.

4. Уровень L- селектина, являясь отражением хронического аутоиммунного воспаления, после трансплантации МСК ( $8,9 \pm 0,5$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) и индукционной терапии ИНФ ( $9,6 \pm 0,8$  нг/мл,  $p > 0,1$ ) практически не снижался, что предполагает назначение длительной терапии ИНФ и повторных трансплантаций МСК.

5. Молекулы адгезии P- селектин, E-селектин, L- селектин, интегрин — sVCAM-1 являются современными маркерами воспаления и могут быть использованы для оценки эффективности стандартной и биологической терапии при БК и служить критериями прогноза течения заболевания.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

**РОЛЬ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТАНДАРТНОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА**



Рис. 6. Болезнь Крона слепой кишки



Болезнь Крона сигмовидной кишки.

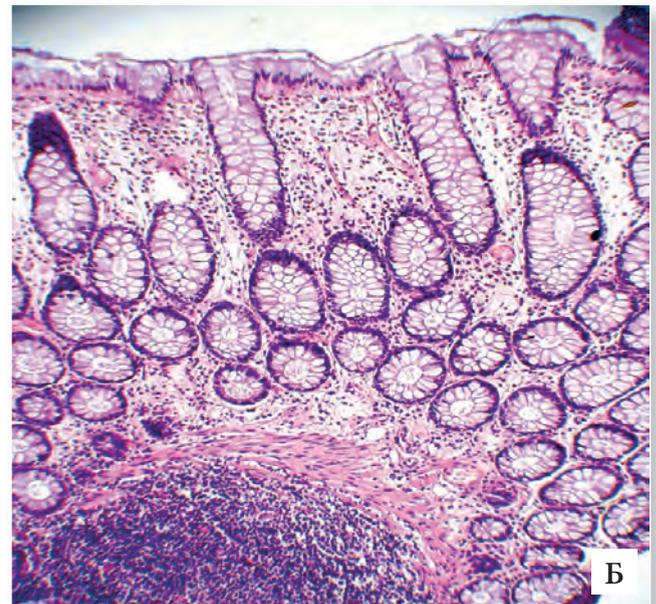
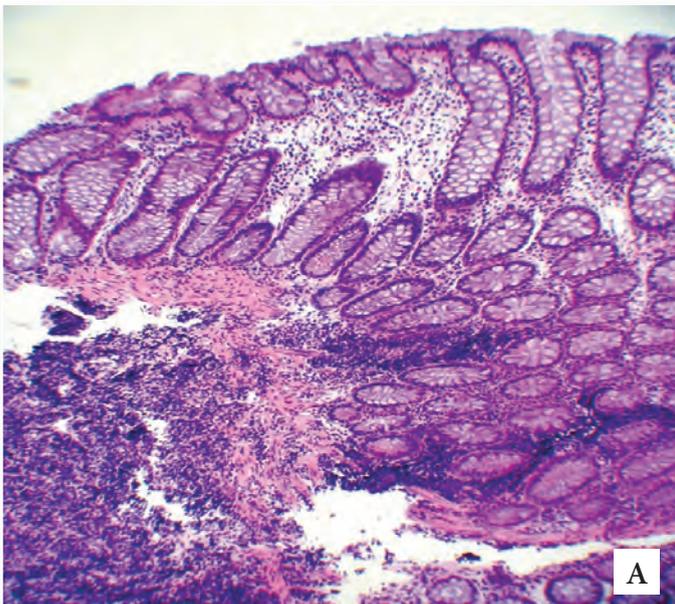
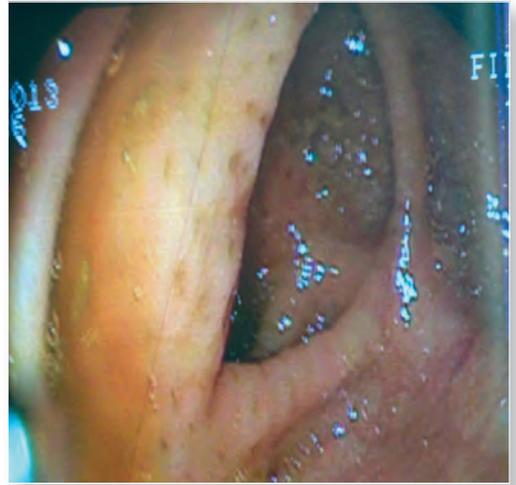
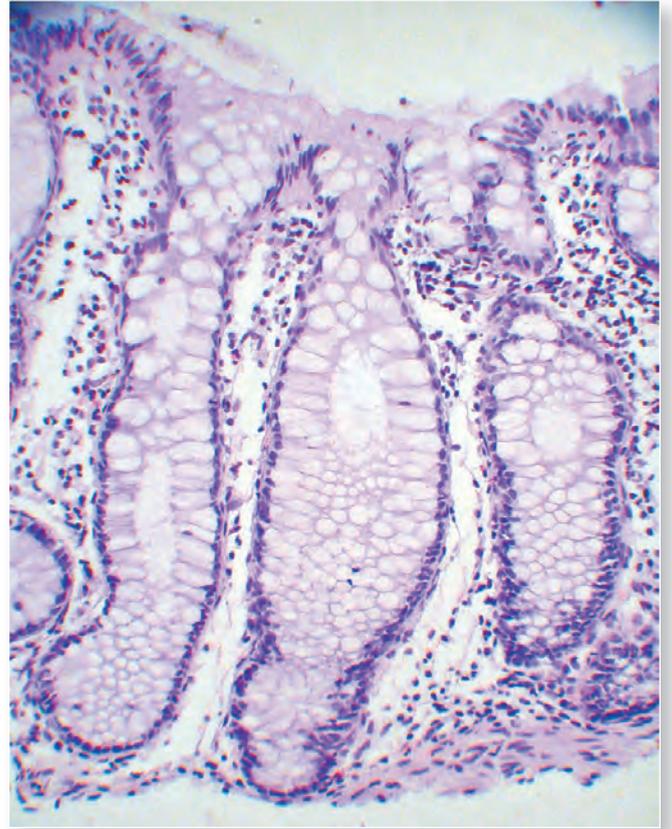
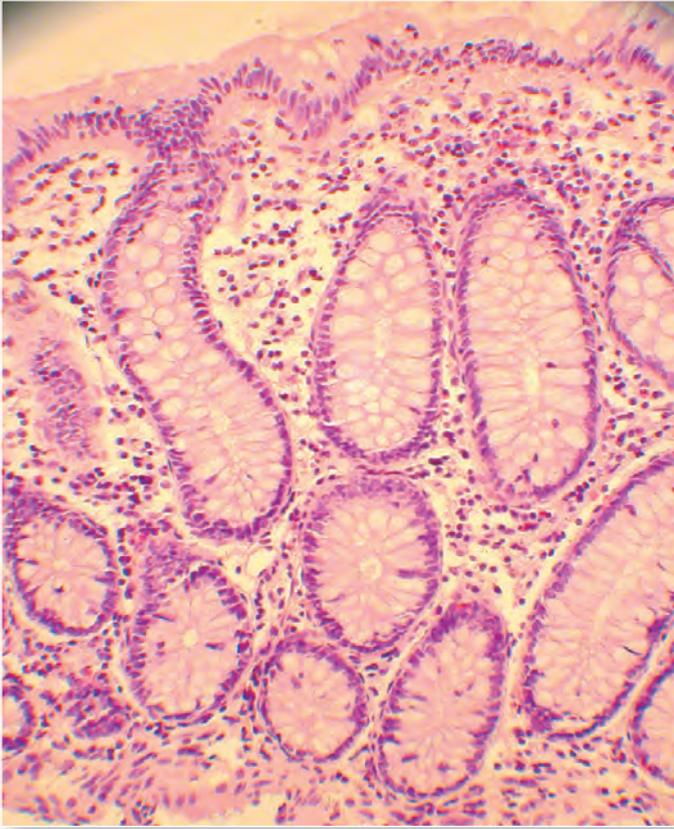


Рис. 7. Болезнь Крона толстой кишки. А) Активная фаза. Лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки, распространение инфильтрации на слизистый и подслизистый слой. Б) Фаза ремиссии после терапии инфликсимабом. Уменьшение воспалительной инфильтрации собственной пластинки. Положительная динамика: лейкоцитарная инфильтрация в подслизистом слое.



**Рис. 9 а, б.** Контрольная биопсия слизистой толстой кишки больного Л., 25 лет через 2 месяца после трансплантации МСК. Крипты обычной глубины. Эпителиальная выстилка крипт содержит большое количество бокаловидных клеток. Собственная пластинка слабо инфильтрирована лимфоцитами и плазмоцитами (а). Крипты обычной конфигурации. Отмечается гиперплазия бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке крипт (б). ГЭ. X250.