АЛЛОГЕННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ: ДВА ГОДА НАБЛЮДЕНИЯ

Лазебник Л. Б.[1], Князев О. В.[1], Коноплянников А. Г.[2], Парфенов А. И.[1], Ручкина И. Н.[1], Михайлова З. Ф.[1], Царегородцева Т. М.[1], Хомерики С. Г.[1], Рогозина В. А.[1], Гудкова Р. Б.[1], Щербаков П. Л.[1], Коноплянникова О. А.[2]

[1] ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москвы

[2] Медицинский радиологический научный центр РАМН, г. Обнинск

Князев Олег Владимирович
111123, Москва, шоссе Энтузиастов, д. 86
Тел.: 8 (495) 304 3078
E-mail: oleg7@bk.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: определить эффективность и безопасность применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга в лечении больных язвенным колитом (ЯК).

Материал и методы. В исследование были включены 44 больных язвенным колитом (ЯК), которым была осуществлена трансплантация МСК, 40 больных ЯК, которым проводилась стандартная терапия препаратами месалазина (салофалька) 4 – 6 г/сутки, кортикостероидами (преднизолон) — 1 – 2 мг/кг, азатиоприном — 1,5 мг/кг, метотрексатом 20 – 50 мг/м^2, и 12 больных, которым проводилась индукционная и поддерживающая терапия инфликсимабом. За 2 – 3 дня до введения МСК отменяли иммунодепрессанты, снижали дозу кортикостероидов до 15 – 20 мг/сут, дозу аминосалицилатов оставляли на уровне 2,0 г/сут. Для количественной оценки результатов использовали средние величины индексов клинической активности Рахмилевича, индексов эндоскопической и гистологической активности шкал Мейо и Гебса. Наблюдение за больными продолжалось в течение 24 месяцев с момента трансплантации. Определяли показатели гуморального иммунного статуса (иммуноглобулины A, G, M, аутологичные антитела), цитокинового профиля. Клетки костного мозга получали из грудины или гребня подвздошной кости донора. Путем культивирования к концу 5 – 6-й недели получали популяции аллогенных МСК донора в количестве (1,5–2) $\times$ 10^8 клеток, необходимой для трансплантации больному. Культуру МСК вводили капельно в /в однократно.

Результаты. У 34 (72,7%) больных ЯК после введения МСК отмечено статистически значимое по сравнению с группой больных, получавших терапию только препаратами 5-аминосалициловой кислоты и глюкокортикостероидами, снижение индексов клинической и морфологической активности воспалительного процесса. У 12 больных ЯК включение МСК в программу лечения не оказало терапевтического эффекта. Применение МСК позволило отменить кортикостероиды у большинства больных с гормонозависимой и гормонорезистентной формами ЯК, а у 7 снизить дозу преднизолона до 5 мг/сут, ограничившись применением препаратов 5-АСК. По противовоспалительной эффективности комплексная терапия с МСК сопоставима с терапией инфликсимабом.

Заключение. Использование МСК может быть оценено как новое стратегическое направление терапии ЯК. МСК, введенные в /в, оказывают мощное иммуномодулирующее влияние, снижают активность аутоиммунного воспаления и стимулируют репаративный процесс в слизистой оболочке кишечника, тем самым увеличивая продолжительность ремиссии, снижает риск развития рецидива заболевания, снижает частоту госпитализаций.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; непрерывное течение; рецидивирующее течение; язвенный колит.

SUMMARY

The aim of the study was to determine the efficacy and safety of mesenchymal stromal cells (MSCs) of bone marrow in the treatment of patients with ulcerative colitis (UC).

Materials and methods. The study included 44 patients with ulcerative colitis (UC), which was implemented MSC transplantation, 40 patients with UC who received standard therapy with mesalazane (salofalka) 4–6 g/day and corticosteroids (prednisone) — 1–2 mg/kg, azathioprine — 1,5 mg/kg methotrexate 20–50 mg/m^2, and 12 patients who underwent induction and maintenance of infliximab therapy. 2–3 days prior to the induction of MSCs abolish immunosuppressive doses of corticosteroids reduced to 15–20 mg/day dose of aminosalicylates was left at 2.0 g/day. To quantify the results using the average values of indices of Rahmilevich clinical activity, indices of endoscopic and histological activity scales Mayo and Gebs. The patients were observed for 24 months after transplantation. Were studied parameters of the humoral immune status (immunoglobulin A, G, M, autologous antibody), cytokine profile. Bone marrow cells were obtained from the donor`s sternum or the iliac crest. By culturing the end of 5 to 6 weeks received a population of allogeneic donor`s MSCs in the amount of (1,5-2) $\times$ 10^8 cells needed for transplant patient. Culture of MSCs injected in the drip i/v, single dose.

Results. In 34 (72,7%) patients with UC after the induction of MSCs was statistically significant compared with the group of patients treated with drugs only 5-aminosalicylic acid and corticosteroids, reducing the clinical and morphological indices of inflammatory activity. In 12 patients with UC include MSCs in the treatment program did not have a therapeutic effect. Application of MSC allowed to cancel corticosteroids in most patients with hormone-dependent and steroid resistance forms of UC, and in 7 to reduce the dose of prednisolone to 5 mg / day, limiting the use of drugs 5-ASA. According to the anti-inflammatory effectiveness of combined therapy with MSCs comparable to infliximab therapy.

Conclusion. The use of MSCs can be evaluated as a new strategic direction for therapy UC. MSC, introduced in I / O, have powerful immunomodulatory effects, reduce the activity of autoimmune inflammation and stimulate the reparative process in the intestinal mucosa, thereby increasing the duration of remission, reduces risk of recurrence of disease, reduces the frequency of hospitalizations

Keywords: mesenchymal stromal cells; a continuous flow; relapsing course; ulcerative colitis.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), представляют одну из наиболее серьезных и нерешенных проблем в современной гастроэнтерологии. По уровню заболеваемости ВЗК значительно уступают другим заболеваниям органов пищеварения, но по тяжести течения, частоте осложнений и летальности они во всем мире занимают одно из ведущих положений в структуре болезней желудочно-кишечного тракта. Последнее десятилетие отмечается постоянным ростом заболеваемости этой патологией в мире [1]. ЯК наиболее широко распространен в Европе и Северной Америке. В этих регионах частота возникновения ЯК (первичная заболеваемость) колеблется от 4 до 20 случаев на 100000 человек, составляя при этом в среднем 8 – 10 случаев в год. Распространенность ЯК составляет от 30 до 240 случаев. По материалам проводимых международных конгрессов по изучению ВЗК, в последующие десятилетия прогнозируется рост заболеваемости ЯК в странах Азии и Восточной Европы [2]. Наибольшее число случаев приходится на возраст 20 – 40 лет. По тяжести течения, частоте осложнений и потере трудоспособности в молодом возрасте он занимает одно из первых мест в структуре болезней желудочно-кишечного тракта. В лечении воспалительных заболеваний кишечника достигнут определенный прогресс, но у значительной части пациентов эффективность данной терапии остается низкой. Это связано с прогрессирующим рецидивирующим течением, неэффективностью хирургического лечения, развитием тяжелых, угрожающих жизни осложнений, необходимостью пожизненной, дорогостоящей терапии глюкокортикоидами, иммуносупрессорами и другими препаратами системного действия. В исследованиях B. Moun и соавт. показано, что риск рецидива в течение первого года после установления диагноза ВЗК составляет 50% при ЯК и 47% при БК [3], в клинике Мэйо было показано, что у больных, впервые леченных стероидными гормонами, только у 49% наблюдался пролонгированный ответ, у 22% развилась стероидозависимость, а у 29% возникла необходимость в колэктомии из — за резистентности к лечению [4]. Примерно у 20 – 40% пациентов требуется серьезное хирургическое вмешательство, хотя и после этого заболевание часто рецидивирует. Данные проблемы требуют разработки новых терапевтических направлений в лечении больных с ВЗК.

Прогресс в изучении молекулярных мишеней воспаления при ВЗК способствовал серьезному успеху антицитокиновой или биологической терапии. Накопленный опыт показал, что моноклональные антитела — ингибиторы провоспалительных цитокинов способны быстро купировать рецидив, обеспечивать длительную ремиссию и уменьшить потребность в гормонах у значительного числа больных с гормонорезистентной и гормонозависимой формами БК и ЯК. К числу таких препаратов относится инфликсимаб (ИНФ). Однако появление этого препарата не решило проблему достижения ремиссии у всех больных. Исследователи показывают, что до трети

больных не отвечают на антицитокиновую терапию (первичная неэффективность инфликсимаба) [5 – 8], у части больных, регулярно получающих поддерживающие инфузии ИНФ, в последующем развивается его вторичная неэффективность [9], к препарату нередко развивается интолерантность, что вынуждает отказываться от дальнейшего его введения [10]. Проводимые клинические испытания некоторых препаратов данной группы *(Daclizumab, Visilizumab, Etanercept)* были приостановлены либо из-за выраженной токсичности и развития серьезных осложнений, либо ввиду отсутствия достоверной разницы в эффективности в двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях [11]. Таким образом, суммируя все причины, можно говорить, что около 40% больных воспалительными заболеваниями кишечника нуждаются в проведении альтернативной биологической терапии [12]. В свете этого перед врачом-гастроэнтерологом стоит задача дальнейшего поиска методов, направленных на уменьшения выраженности клинических проявлений заболевания, предотвращение возникновения рецидивов, минимизацию побочных эффектов лечения, улучшение качества жизни.

Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии стало возможным разрабатывать новые способы лечения с использованием костномозговых стволовых клеток, которое получило название «регенеративная медицина», целью которой является замещение, регенерация и обновление поврежденных клеток и тканей, восстановление их функции путем дифференциации клеток-предшественников и/или путем активации эндогенных резидентных стволовых клеток. Данная триада признана в настоящее время парадигмой регенеративной медицины [13]. Клеточная трансплантация как наиболее физиологичный вариант заместительной терапии получает все большее распространение. Этот метод рассматривается как возможный дополнительный либо самостоятельный способ коррекции функциональной несостоятельности некоторых органов и тканей. Многие исследователи расценивают в перспективе имплантацию культур клеток как метод, в определенной степени альтернативный органной трансплантации [14].

Современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволяет рассматривать стволовую клетку как одно из средств лечения многих заболеваний. Открытие в 60-е годы XX века А. Фриденштейном мезенхимальных стромальных клеток (МСК) [15] положило начало исследованиям роли этих клеток в регенерации поврежденных тканей взрослого организма. Сведения о биологии мезенхимальных стволовых клеток значительно расширилось за эти годы [16]. Многолетние исследования показали, что эти клетки обладают способностью дифференцироваться в костную, хрящевую и соединительную ткани [17], костномозговые элементы [18], миобласты [19], кардиомиоциты [20; 21], эндотелиальные [22] и нервные клетки [23]. Существует ряд работ, демонстрирующих дифференцировку СК в слизистой оболочки кишечника в зрелые энтероциты [24; 25].

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека характеризуются отсутствием антигена гистосовместимости II класса и низким уровнем экспрессии антигена гистосовместимости I класса [26], эти клетки предотвращают Т-клеточный ответ как непрямым путем через модуляцию дендритных клеток, так и непосредственно, нарушая функцию NK-клеток, а также $CD8^+$- и $CD4^+$-Т-клеток [27; 28]. Следовательно МСК могут рассматриваться как кандидаты не только для аутологичной, но и для аллогенной клеточной терапии, что может быть более предпочтительно именно при аутоиммунных заболеваниях, так как МСК собственного организма не всегда способны купировать иммунопатологический процесс.

МСК также обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным эффектом путем продукции простагландинов и интерлейкина-10, которые и создают иммуносупрессивную среду в ткани, подвергшейся иммунной агрессии [29]. Все эти данные расширяют возможности клинического применения МСК костного мозга человека.

Успех высокодозной иммуносупрессивной терапии с трансплантацией стволовых клеток при системной красной волчанке [30], рассеянном склерозе [31], ревматоидном артрите [32], апластической анемии, аутоиммунной тромбоцитопении [33] и ряде других аутоиммунных заболеваний [34] привел к тому, что в ведущих медицинских центрах Европы и США в конце 90-х годов были начаты исследования эффективности этого метода у больных с болезнью Крона и язвенным колитом.

Первое сообщение об аллогенной трансплантации стволовых клеток костного мозга больному с БК, которая была выполнена по поводу лимфомы, относится к 1993 году [35]. В настоящее время ограниченные клинические испытания показали, что при лечении ВЗК методом трансплантации стволовых клеток в большинстве случаев удается достичь положительного эффекта, даже если все другие методы терапии оказались безуспешными. Процедура лечения хорошо переносится, и у большинства пациентов удается достичь устойчивой, а иногда и полной ремиссии заболевания [36]. Предварительные исследования показали, что МСК могут направленно двигаться в область воспаления и подавлять воспалительный процесс, одновременно стимулируя регенерацию ткани.

Получены положительные результаты, свидетельствующие об эффективности местной клеточной терапии БК. У пяти пациентов была проведена имплантация клеточного препарата в ткани,

окружающие фистулы. В 6 случаях (75%) наружное отверстие свища к концу 8-й недели было уже покрыто эпителием и, таким образом, фистула считалась зажившей. В других случаях наблюдали неполное закрытие наружного отверстия с достоверным снижением отделяемого. Ни в одном случае не было отмечено развития каких-либо побочных эффектов при среднем сроке наблюдения 22 месяца [37]. Недавно опубликованные исследования демонстрируют дополнительные доказательства эффективности местной терапии. В исследование II фазы были включены 49 пациентов со сложными свищами заднего прохода, которые были рандомизированы по методу лечения: местная терапия с применением фибринового клея и фибриновый клей в сочетании с 40 миллионами МСК, полученных из жировой ткани. Закрытие свищей отмечалось у 71% больных БК в течение 12 месяцев наблюдения, которые получали комбинированную терапию, по сравнению с 14% больных, получавших монотерапию фибриновым клеем [38]. Авторы отметили, что дополнительная инъекция стволовых клетки в свищ исключает необходимость его последующего иссечения.

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что трансплантация кроветворных стволовых клеток на сегодняшний день стала одним из самых многообещающих подходов к комплексному лечению хронических воспалительных заболеваниях кишечника, особенно для пациентов, которым не помогает стандартная терапия, трансплантация МСК может стать дополнительным методом лечения болезни Крона, позволяющим обойтись без калечащих хирургических операций [39; 40]. Клинический опыт свидетельствует, что более успешной может быть аллогенная трансплантация стволовых клеток, нежели аутологичная. Проведенные исследования легли в основу новой концепции балансировки иммунной системы вместо концепции полной эрадикации аутоиммунного пула клеток. А это позволит, в свою очередь, избежать высокодозной иммуносупрессивной терапии и ее осложнений.

Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток при лечении тяжелых, рефрактерных форм различных заболеваний в настоящее время не является стандартной терапией и требует дальнейшего проведения клинических исследований, однако уже сейчас эффективность данного метода убеждает в необходимости расширения дальнейших исследований. До широкого внедрения этого вида терапии в клиническую практику необходимо будет решать вопрос об определении четких клинических, эндоскопических, иммунологических показаний для данного метода лечения. На данный момент до конца не определены механизмы действия аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, существующие публикации о биологической терапии БК не дают ответ на вопрос об оптимальных сроках, частоте и необходимом количестве клеточного материала, нет четких клинических, эндоскопических и лабораторных показаний для трансплантации МСК с целью достижения оптимального эффекта от данного вида терапии. Остается открытым вопрос о месте трансплантации МСК в схеме лечения БК, а сведения о данном методе терапии при ЯК вообще единичные. Нами выбраны наиболее адекватный способ введения и методы оценки клинической эффективности клеточной терапии. Положительные предварительные результаты проводимых в различных странах мира клинических и экспериментальных исследований обосновывают актуальность, перспективность и достаточную безопасность метода трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для лечения больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Мы располагаем личным опытом лечения мезенхимальными стромальными клетками больных язвенным колитом. Достигнуто улучшение в течении заболевания, что побуждает к дальнейшей оценке эффективности клеточной терапии. Приводим клиническое наблюдение, демонстрирующее положительный эффект лечения больных ЯК мезенхимальными стромальными клетками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С февраля 2008 по март 2010 года наблюдали три группы больных язвенным колитом (ЯК): 40 пациентов, получавших стандартную терапию препаратами 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикостероидами (ГКС) (2-я группа), 44 больных (1-я группа), которым дополнительно осуществляли системную трансплантацию аллогенных МСК, выращенных в культуре, и 12 больных, которым проведена индукционная и поддерживающая терапия инфликсимабом (3-я группа). Культуру МСК выращивали из костного мозга здорового донора того же пола. Возраст больных находился в пределах от 19 до 60 лет (медиана — Me — 30 лет), большинство (26) составляли мужчины. Продолжительность болезни составляла от 6 месяцев до 10 лет (Me 2 года). Существенных различий в группах больных по этим показателям не было.

Современная клиническая классификация язвенного колита учитывает распространенность процесса, выраженность клинических и эндоскопических проявлений, характер течения заболевания.

В *табл. 1* показана характеристика больных в зависимости от протяженности поражения кишечника и характера течения. Дистальный ЯК (проктосигмоидит) установлен у 3 больных 1-й группы и у 2 больных 2-й группы, левосторонний (поражение до селезеночного изгиба) — у 7 и 7, субтотальный и тотальный колит — у 34 и 31 больного соответственно, у всех 12 больных, которые получали терапию ИНФ, было тотальное поражение толстой кишки. По характеру течения у 5 больных ЯК установлен впервые, у 29 больных в 1-й группе наблюдалось хроническое рецидивирующее, у 10 — непрерывное течение, во 2-й — у 25

и 10 соответственно, третью группу составляли больные с хроническим рецидивирующим течением. Распределение больных язвенным колитом в зависимости от тяжести атаки представлено в *табл. 2,* из которой видно, что основная группа представлена больными со среднетяжелым течением заболевания.

Все больные получали по показаниям препараты 5-АСК (сульфасалазин, месалазин), кортикостероиды (метипред, преднизолон), иммунодепрессанты (азатиоприн, метотрексат) и другие противовоспалительные средства. Больным основной группы наблюдения за 2 – 3 дня до введения МСК отменяли иммунодепрессанты, снижали дозу кортикостероидов до 20 – 30 мг/сут, дозу аминосалицилатов оставляли на уровне 2,0 г/сут.

Контроль за динамикой клинических симптомов и лабораторных показателей, включая определение уровня онкомаркеров (СА 19 – 9 и СА 242), осуществляли ежемесячно. Через 2, 6, 12 и 24 месяца больным проводили эндоскопическое исследование с множественной биопсией патологически измененной слизистой оболочки кишечника. Для количественной оценки использовали средние величины индексов клинической и эндоскопической активности Мейо. Эндоскопическое исследование проводили на видеосистеме фирмы «Фуджинон EVE W-88A». Эндоскопическую картину ЯК оценивали с помощью шкалы Мейо. Оценку гистологических препаратов слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) осуществляли по шкале Гебса [41]. Наблюдение за больными продолжалось в течение 24 месяцев.

Исходный индекс клинической активности у больных 1-й группы, получавших стандартную терапию + МСК, в среднем составил 7,7 ± 0,3 балла, у больных 2-й группы — 7,2 ± 0,4 балла ($p > 0,05$), в группе больных, получавших терапию инфликсимабом — 8,2 ± 0,42. Таким образом, 1-я и 2-я группы были сопоставимы по основным клиническим показателям. Показатели эндоскопической активности ЯК в каждой из трех групп находились в пределах от 6 до 12 баллов и в среднем составляли 8,3 ± 0,2, 8,1 ± 0,2 и 8,5 ± 0,5 балла соответственно.

Перед введением МСК и через 2, 6, 12 и 24 месяца определяли в сыворотке крови показатели гуморального иммунного статуса (Ig A, M и G), про- и противовоспалительные цитокины (ИЛ-2, ИЛ-4, α-ФНО, ИНФ-γ) и аутологичные антитела (IgG-BPI). Применяли иммуноферментный метод, использовали тест-системы *Orgentec* (Германия), «Евроиммун», «Ведалаб» (Франция).

Таблица 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ЯК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОТЯЖЕННОСТИ ПОРАЖЕНИЯ КИШЕЧНИКА И ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ

Характеристика больных	**Группы больных**		
Протяженность поражения кишечника при ЯК	**1-я (*n* = 44)**	**2-я (*n* = 40)**	**3-я (*n* = 12)**
До нисходящей кишки (проктосигмоидит)	3/6,8	2/5	
До селезеночного изгиба	7/16	7/17,5	
До печеночного изгиба	4/9	5/12,5	
Тотальное поражение толстой кишки	30/68,1	26/65	12/100
Течение заболевания:			
впервые выявленное	5/11,4	5/12,5	
хроническое рецидивирующее	29/65,9	25/62,5	12/100
хроническое непрерывное	10/22,7	10/25,0	

Примечание: в числителе — абсолютное число больных, в знаменателе — процент.

Таблица 2

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ТЯЖЕСТИ АТАКИ

Тяжесть атаки (Truelove & Witts, 1955, с дополнениями проф. М. Х. Левитана и проф. Е. А. Белоусовой)	**1-я (*n* = 44)**	**2-я (*n* = 40)**	**3-я (*n* = 12)**
Легкая	3/6,7	2/5	—
Среднетяжелая	37/84	36/90	8/75
Тяжелая	4/9,3	2/5	4/25

Примечание: в числителе — абсолютное число больных, в знаменателе — процент.

При определении рисков по методике «заболеваемость» учитывались новые случаи исходов (рецидивов), возникших за время наблюдения в обеих группах больных. К наиболее распространенным показателям оценки риска относятся: относительный риск, или соотношение рисков (Risk Ratio — RR), соотношение шансов (Odds Ratio — OR);соотношение оценок (Rate Ratio); снижение абсолютного риска (Absolute risk reduction) и число пациентов, которых необходимо пролечить (Number needed to treat) [42].

Для оценки продолжительности ремиссии нами использовался метод Каплана и Майера построения кривых выживаемости [43], который может быть использован практически при любом количестве пациентов, отражающих вероятность пережить определенное время без отрицательного события, в нашем случае без рецидива заболевания. Точка начала отсчета выживаемости — дата включения в исследование, точка окончания отсчета выживаемости — дата последнего наблюдения, отрицательное событие — рецидив заболевания.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением прикладных программ *Microsoft® Office Excel 2003; Statistica v. 6,0; Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998.*

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ И ВВЕДЕНИЯ МСК

Методика получения и размножения аутологических и аллогенных МСК в необходимом для системной пересадки количестве (150 – 200 млн клеток) опубликована [44]. Метод разрешен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития МЗиСР РФ Медицинскому радиологическому научному центру РАМН, г. Обнинск (лицензия ФС-2006/206). Перед внутривенным введением МСК делали посев из полученных выращиванием в культуре популяций клеток для контроля возможного бактериального загрязнения (его не было выявлено ни в одном случае). Культуру МСК, выращенную из костного мозга здорового донора того же пола, вводили капельно в/в однократно на 200 мл стерильного физиологического раствора, содержащего гепарин в концентрации 50 Ед/мл, и путем постановки капельницы вводились пациенту в течение 40 – 60 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОГО КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ ЗА БОЛЬНЫМИ ЯК

Несмотря на постоянно расширяющийся спектр лекарственных препаратов для лечения ЯК, около 30% больных в любой популяции резистентны к консервативной терапии. Резистентным к лечению может оказаться любой больной, и альтернативным методом лечения в данном случае будет оперативное вмешательство. Причиной резистентности к лечению можно считать отсутствие достоверных критериев для выбора того или иного лечебного подхода. Выбор метода терапии осуществляют в зависимости от выраженности клинических симптомов, общего состояния пациента, от локализации и активности воспалительного процесса. Многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что даже при сходных общеклинических характеристиках течение ЯК отличается значительным полиморфизмом, что проявляется началом заболевания в разном возрасте, разной протяженностью воспалительного процесса, наличием у ряда больных системных проявлений, разной частотой рецидивирования и длительностью ремиссии.

На основе анализа показателей клинической, эндоскопической активности, индекса шкалы Гебса мы оценили эффективность выбранных методов терапии и проанализировали особенности клинического течения язвенного колита.

В 1-й группе больных (n = 44) через 2 месяца наблюдения клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 21 больного ЯК (42,7%), клиническое улучшение, которое сопровождалось уменьшением частоты стула и кровопотери, отсутствием болей в животе, нормализацией самочувствия, — у 17 больных (38,7%), ранний рецидив отмечался у 6 больных (13,6%) при снижении дозы ГКС и отмене азатиоприна. Характер течения язвенного колита в группе больных, получавших препараты 5-АСК и ГКС (n = 40), выглядел следующим образом. Через 2 месяца наблюдения ранний рецидив произошел у 3 больных (7,5%), клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 20 (50,0%), клиническое улучшение течения заболевания — у 17 (42,5%).

Через 6 месяцев индекс клинической активности у больных 1-й группы составил 1,8 ± 0,3 балла, у больных 2-й группы – 2,7 ± 0,4 балла, в группе больных 3-й группы — 2,0 ± 0,3, индекс эндоскопической активности Мейо по группам составил 0,7 ± 0,15; 2,4 ± 0,25 и 0,7 ± 0,1 балла соответственно. Через 6 месяцев наблюдения у всех больных 1-й группы достигнута клинико-эндоскопическая ремиссия и клиническое улучшение (n = 38), рецидив произошел у 4 больных (10,5%) из группы, вышедшей только в клиническую ремиссию. Таким образом, в 1-й группе МСК за 6 месяцев наблюдения ремиссия сохранялась у 34 больных (77,3%), малоэффективной терапия оказалась у 10 (22,7%). Во 2-й группе за этот же период наблюдения обострение ЯК наступило у 12 (30%) больных, ремиссия сохранялась у 18 больных (45%), клиническое улучшение — у 10 (25%) больных. В группе больных, получающих инфликсимаб (3-я группа), за полгода наблюдения рецидивов отмечено не было, клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 7 больных (58,3%), клиническое улучшение — у 5 (41,7%) больных.

За год наблюдения отмечалась следующая динамика течения язвенного колита по группам больных в зависимости от метода выбранной терапии

заболевания. В 1-й группе больных, которым осуществлена трансплантация МСК, уровень индекса клинической активности оставался на прежнем уровне — 1,8 ± 0,3 балла, у больных 2-й группы, получающих препараты 5-АСК/ГКС, — 2,9 ± 0,4 балла, что незначительно превысило уровень полугодовой давности, в группе больных 3-й группы уровень индекса клинической активности также остался прежним — 2,0 ± 0,3, индекс эндоскопической активности Мейо по группам составил 0,76 ± 0,2, 2,6 ± 0,4 и 0,8 ± 0,1 балла соответственно.

В течение года наблюдения отмечалось достоверное повышение индекса клинической и эндоскопической активности во 2-й группе по сравнению с группами больных, получающих инфликсимаб и МСК. Ремиссия сохранялась у 32 (72,7%) больных с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением язвенного колита (n = 39), обострение заболевания наступило в первой группе МСК у 2 (5,8%) больных из 34, которые «пережили» 6-месячную ремиссию. Клинические симптомы исчезли у 2 (4,6%) больных с непрерывным течением язвенного колита (n = 10), исчезновение клинических симптомов с последующей положительной клинической динамикой наблюдалось у 1 больного (2,3%), положительная клиническая и эндоскопическая динамика наблюдалась у 2 больных (4,6%). У 5 больных (11,4%) с непрерывным течением язвенного колита на фоне положительной динамики сохраняется клинико-эндоскопическая ремиссия. У 4 (9,0%) больных с рецидивирующим течением язвенного колита (n = 29) исчезли клинические симптомы, исчезновение клинических симптомов с последующей положительной клинической динамикой наблюдалось у 1 больного (2,3%), положительная клиническая и эндоскопическая динамика наблюдалась у 1 больного (2,3%) и у 22 больных (50,0%) сохраняется клинико-эндоскопическая ремиссия ЯК. Таким образом, через 12 месяцев наблюдения у больных с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением язвенного колита эффективность системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга составила 72,7%, неэффективной терапия оказалась у 12 больных (27,3%) — сохранялся частый жидкий стул с примесью крови, лихорадка, — которые в последующем получали высокие дозы ГКС или были переведены на терапию инфликсимабом.

Во 2-й группе 5-АСК/ГКС за год наблюдения отмечалось достоверное повышение индекса клинической и эндоскопической активности до 2,9 ± 0,4 и 2,6 ± 0,4 балла соответственно по сравнению с уровнем активности через 2 месяца от начала терапии. Ремиссия сохранялась у 15 (37,5%) больных с хроническим непрерывным, хроническим рецидивирующим течением язвенного колита и впервые выявленным заболеванием (n = 40), обострение заболевания наступило у 12 (43%) больных из 28, которые «пережили» 6-месячную ремиссию (у 30% больных из всей группы наблюдения). Клинические симптомы исчезли у больных с непрерывным течением (n = 10) у 3 (7,5%) больных, исчезновение клинических симптомов с последующей положительной клинической динамикой наблюдалось у 1 больного (2,5%), положительная клиническая и эндоскопическая динамика также наблюдалась у 1 больного (2,5%) и у 5 больных (12,5%) с непрерывным течением язвенного колита на фоне положительной динамики сохраняется эндоскопическая ремиссия, исчезновение клинических симптомов заболевания. У больных с рецидивирующим течением (n = 25) у 8 (20,0%) исчезли клинические симптомы, исчезновение клинических симптомов с последующей положительной клинической динамикой наблюдалось у 7 больных (5,0%), положительная клиническая и эндоскопическая динамика наблюдается у 2 больных (5,0%) и у 8 больных (20,0%) сохраняется клинико-эндоскопическая ремиссия ЯК. Таким образом, через 12 месяцев наблюдения у больных с хроническим непрерывным, хроническим рецидивирующим течением язвенного колита и впервые выявленным заболеванием эффективность стандартной терапии составила 37,5% (n = 15), неэффективной — у 62,5% (n = 25). Частота госпитализаций за 12 месяцев наблюдения составила в 1-й группе больных 20,5%, во 2-й — 66,6%, что подтверждает более стойкую ремиссию у больных, которым проведена трансплантация МСК (p < 0,05).

В группе получавших инфликсимаб из 12 больных рецидив через год произошел у 2, клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 7 больных, клиническая ремиссия — у 3.

За 24 месяца наблюдения у больных язвенным колитом с хроническим непрерывным, хроническим рецидивирующим течением и впервые выявленным заболеванием, которым проведена системная трансплантация аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в 1-й группе больных (n = 44), клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 30 больных (68,2%), десяти больным ЯК (22,7%) проведена терапия высокими дозами ГКС и иммуносупрессорами, 4 больных переведены на индукционную и поддерживающую терапию инфликсимабом (9,1%). В группе 5-АСК/ГКС (2-я группа) стойкий ответ на терапию сохранялся у 15 (37,5%) больных, 8 пациентов получали высокие дозы ГКС и иммуномодуляторы (20%), трансплантация осуществлена 15 больным (37,5%), на терапию инфликсимабом переведены 7 больных (17,5%). В 3-й группе больных клинико-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 6, клиническая ремиссия — у 4, рецидив заболевания с частой диареей, кровопотерей, лихорадкой произошел у 2 больных. Трансплантация МСК позволила снизить частоту госпитализаций: доля госпитализированных больных в связи с обострением ЯК за 24 месяца наблюдения составила 31,8% в 1-й группе и 62,1% — во 2-й (p < 0,05).

Суммарный индекс клинической активности у больных 1-й группы достоверно снизился в среднем с 8,3 ± 0,26 до 1,55 ± 0,3 балла, у больных 2-й группы — с 8,1 ± 0,2 до 1,4 ± 0,2 балла, в группе больных 3-й группы, получающих инфликсимаб, — с 8,5 ± 0,5 до 1,3 ± 0,2. Достоверной разницы в величине индекса между группами через 2 месяца после проведенной терапии не было. Динамика индекса клинической активности и индекса эндоскопической активности Мейо за 24 месяца наблюдения представлена в *табл. 3, 4.*

В *табл. 4* показана динамика индекса эндоскопической активности Мейо в группах больных ЯК через 2, 6, 12 и 24 месяца лечения. Величина индекса у больных 1-й группы составляла 7,7 ± 0,3 балла, у больных 2-й группы — 7,2 ± 0,4, в 3-й группе — 8,2 ± 0,42. Через 2 месяца индекс достоверно снизился в 1-й, 2-й и 3-й группах до 1,16 ± 0,09 ($p < 0,05$), 1,43 ± 0,15 ($p < 0,05$), 1,2 ± 0,1 балла ($p < 0,05$) соответственно, объективно подтверждая уменьшение морфологических признаков воспаления слизистой оболочки толстой кишки. В дальнейшем индекс эндоскопической активности ЯК уже значительно отличался: у больных 1-й группы через 6 и 12 месяцев он продолжал снижаться до 0,7 ± 0,15 и 0,76 ± 0,15 балла, приближаясь к уровню ремиссии, через 24 месяца он составил 0,68 ± 0,1. У больных 2-й группы он за этот же период повысился до 2,4 ± 0,25 и 2,6 ± 0,4 балла ($p < 0,005$), несмотря на отсутствие клинических симптомов рецидива. Динамика индекса Мейо у больных 3-й группы за 24 месяца наблюдения сохранялась на одном уровне — 0,7 ± 0,1; 0,8 ± 0,1 и 0,8 ± 0,1. Таким образом, трансплантация аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга способствует снижению индекса клинической активности воспалительного процесса при язвенном колите через 12 месяцев с 8,3 ± 0,26 до 1,8 ± 0,3 балла (во 2-й группе — с 8,1 ± 0,2 до 2,9 ± 0,4 балла) ($p < 0,05$) и снижению индекса эндоскопической активности у больных ЯК с 7,7 ± 0,3 до 0,76 ± 0,2 (во 2-й группе — с 7,2 ± 0,4 до 2,6 ± 0,4) ($p < 0,05$) и сопоставима по эффективности с терапией инфликсимабом.

Наиболее объективную информацию об активности воспалительного процесса при ЯК дают гистологические методы исследования. Для оценки эффективности терапии мы также использовали интегративный индекс Гебса. До трансплантации МСК в группе больных язвенным колитом индекс Гебса составил 4,4 ± 0,3 и во 2-й группе — 4,4 ± 0,2, в 3-й — 4,35 ± 0,2. По степени патогистологической активности язвенного колита больные трех групп были сопоставимы ($p > 0,05$).

Микроскопически воспалительные изменения при ЯК локализуются в слизистой оболочке и подслизистом слое, они инфильтрированы плазматическими клетками и лимфоцитами, обнаруживаются крипт-абсцессы, микроэрозии и изъязвления. Отмечается расширение кровеносных сосудов, набухание эндотелия, видны тяжи грануляционной ткани, богатой сосудами. При гистологическом исследовании в фазе обострения язвенного колита в слизистой оболочке мы также отмечали расширение капилляров и геморрагии, образование язв в результате некроза эпителия, деструкцию крипт и формирование крипт-абсцесса *(рис. 1 а, б см. на цветной вклейке),* уменьшение количества бокаловидных клеток, инфильтрацию *lamina propria* лимфоцитами, плазматическими клетками, нейтрофилами и эозинофилами *(рис. 2 см. на цветной вклейке).*

Таблица 3

ДИНАМИКА ИНДЕКСА КЛИНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАХМИЛЕВИЧА					
Группа	**Исходный уровень**	**2 месяца**	**6 месяцев**	**12 месяцев**	**24 месяца**
МСК (1-я, $n = 40$)	8,3 ± 0,26	1,55 ± 0,3*	1,8 ± 0,3*	1,8 ± 0,3*	1,6 ± 0,2*
5-АСК/ГКС (2-я, $n = 40$)	8,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2*	2,7 ± 0,4*	2,9 ± 0,4**	2,7 ± 0,3*
ИНФ (3-я, $n = 15$)	8,5 ± 0,5	1,3 ± 0,2*	2,0 ± 0,3*	2,0 ± 0,3*	1,7 ± 0,3*

*Примечание: * — различия достоверны ($p < 0,05$).*

Таблица 4

ДИНАМИКА ИНДЕКСА ЭНДОСКОПИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕЙО					
Группа	**Исходный уровень**	**2 месяца**	**6 месяцев**	**12 месяцев**	**24 месяца**
МСК (1-я)	7,7 ± 0,3	1,16 ± 0,1*	0,7 ± 0,15*	0,76 ± 0,2*	0,68 ± 0,1*
5-АСК/ГКС (2-я)	7,2 ± 0,4	1,43 ± 0,15*	2,4 ± 0,25*	2,6 ± 0,4*	2,0 ± 0,15*
ИНФ (3-я)	8,2 ± 0,42	1,2 ± 0,1*	0,7 ± 0,1*	0,8 ± 0,1*	0,8 ± 0,1*

*Примечание: * — различия достоверны ($p < 0,05$).*

Через 2 месяца трансплантация МСК достоверно приводит к снижению индекса Гебса до 0,7 ± 0,1 по сравнению с группой больных, получающих терапию препаратами 5-АСК/ГКС, — 1,0 ± 0,1 ($p < 0,05$), и сопоставима по эффективности с терапией инфликсимабом, при которой индекс Гебса составил 0,66 ± 0,16. Через 12 месяцев индекс Гебса в 1-й группе остается на прежнем уровне — 1,0 ± 0,1, в то время как во 2-й группе индекс Гебса увеличивается более чем в полтора раза — до 1,2 ± 0,02, в 3-й группе больных, получающих инфликсимаб, степень воспаления слизистой по шкале Гебса — 0,6 ± 0,18. Микроскопически отмечались гиперплазия бокаловидных клеток, расщепление крипт *(рис. 3 см. на цветной вклейке),* появление большого количества бокаловидных клеток среди клеток поверхностного эпителия *(рис. 4 см. на цветной вклейке).* Полученные данные гистологической картины СОТК свидетельствуют о том, что МСК обладают высокой пролиферативной активностью и большим репаративным потенциалом.

Любая терапия должна быть направлена на улучшение прогноза заболевания, улучшение качества жизни больных. Это особенно важно, так как в большинстве случаев ВЗК имеет неблагоприятное течение и приводит большинство пациентов к инвалидизации. Для оценки продолжительности ремиссии нами использовался метод построения кривых выживаемости. При сравнении двух кривых выживаемости (в данном случае стабильности ремиссии) у пациентов с проктосигмоидитом различий выявлено не было ($p = 0,708$), продолжительность ремиссии в группе МСК составила 19,2 ± 2,4 месяца, в группе 5-АСК/ГКС — 17,6 ± 3,1 месяца. Есть значимое различие в группах больных с субтотальным поражением толстой кишки ($p = 0,012$). Продолжительность ремиссии у больных, которым проведена трансплантация МСК, составила 20,0 ± 1,1, в группе, получающих стандартную терапию препаратами 5-АСК/ГКС, — 11,6 ± 1,5. При сравнении кривых выживаемости (стабильности ремиссии) у больных с тотальным поражением толстой кишки также выявлено значимое различие в зависимости от метода лечения больных ($p = 0,036$). Продолжительность ремиссии у больных, получивших МСК, составила 11,5 ± 1,7 месяца, в группе 5-АСК/ГКС — 7,4 ± 0,6 месяца. Однако при сравнении кривых выживаемости (стабильности ремиссии) у больных с тотальным поражением толстой кишки при проведении трансплантации МСК и терапии инфликсимабом различий не было выявлено ($p = 0,554$). Продолжительность ремиссии у больных, получивших МСК, составила 11,5 ± 1,7 месяца, в группе ИНФ — 11,6 ± 0,6 месяца.

После проведенной оценки рисков развития рецидивов заболевания на основе данных исследования получены следующие результаты. Риск развития рецидива ЯК за период наблюдения (12 месяцев) у больных, получивших МСК (1-я группа), составил 0,2051, у больных, получавших только препараты 5-АСК, ГКС (2-я группа), этот показатель составил 0,5333, таким образом, относительный риск (RR) составил 0,3486. При расчете отношения шансов (OR) риск развития рецидива в 1-й группе составил 0,2582, во 2-й — 1,1428, а отношение шансов — 0,2258. Следовательно, абсолютный риск развития рецидива (ARR) ЯК после трансплантации МСК был ниже, чем при проведении терапии препаратами 5-АСК, ГКС и цитостатиками (RR и OR меньше 1).

При сравнении оценки рисков между группой МСК и ИНФ были получены результаты, по своей эффективности свидетельствующие о сопоставимости данных методов терапии ЯК. После проведенной оценки рисков на основе данных исследования получены следующие результаты. Относительный риск развития рецидива язвенного колита за период наблюдения (12 месяцев) при проведении системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга составил 1, отношение шансов — 1. Риск развития рецидива ЯК за период наблюдения (12 месяцев) у больных, получивших МСК (1-я группа), составил 0,22, у больных, получавших инфликсимаб (3-я группа), этот показатель составил 0,2, таким образом, относительный риск (RR) составил 1,1. При расчете отношения шансов (OR) риск развития рецидива в 1-й группе составил 0,29, во 3-й — 0,25, а отношение шансов — 1,2. Следовательно, абсолютный риск развития рецидива (ARR) ЯК после системной трансплантации МСК был сопоставим с терапией инфликсимабом.

Необходимо отметить, что больные, длительно страдающие ВЗК, относятся к группе повышенного риска в отношении онкологических заболеваний кишечника. Считается, что для пациентов с язвенным колитом, болеющим более 10 лет, вероятность возникновения рака возрастает ежегодно на 0,5%. Те пациенты, у которых поражена только ректальная область, имеют наименьший риск возникновения онкологических осложнений. По мере увеличения площади пораженного участка слизистой кишки растет и вероятность развития рака. Также необходимо учитывать, что клеточная терапия является медицинской технологией высокой степени риска. Учитывая вышеизложенное, данной группе больных в период ремиссии необходимо проводить ежегодно контрольные эндоскопические (КС 1 раз в год, РРС 4 раз в год) и рентгенологические исследования кишки. Только во время колоноскопии можно оценить степень прогрессирования болезни, активность воспаления и наличие дисплазии слизистой кишки. Нами проводилась множественная лестничная биопсия с последующим гистологическим исследованием. Однако даже при множественной биопсии мы не можем с полной уверенностью исключить наличие онкологического процесса. Помимо инвазивных

методов ранней диагностики рака, мы ежемесячно определяли уровень онкомаркеров СА 242 и СА 19 – 9. Определение уровня онкомаркеров позволяет выявить группы повышенного риска развития рака. Ни в одном случае уровень онкомаркеров СА 242 и СА19–9 не превышал 7 ед/мл.

ВЛИЯНИЕ МСК НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ БОЛЬНЫХ ВЗК

Экспериментальные работы на моделях артрита [32] и первый клинический опыт пересадки аллогенных МСК больным системной красной волчанкой [30] позволили связать полученный положительный клинический ответ с иммуномодулирующим эффектом МСК. В этом плане интересны полученные нами результаты изменения иммунного статуса больных ЯК под влиянием лечения МСК.

В развитии и течении ВЗК важная роль принадлежит нарушениям функциональной активности иммунной системы. Подтверждением этому служит повышенная циркуляция широкого спектра цитокинов, ИГ, антител. Данные литературы о влиянии МСК на показатели иммунного статуса при ВЗК отсутствуют, что и определило цель настоящего исследования.

ЯК сопровождается повышенной циркуляцией цитокинов, аутоантител, выраженной в различной степени в зависимости от продолжительности, активности, стадии заболевания и проводимой терапии. Максимальное увеличение концентрации сывороточных цитокинов (ИЛ-1), фактор некроза опухоли-α (α-ФНО), интерферон-γ (ИФ-γ), ИЛ-12, ИЛ-4) отмечены у больных с впервые выявленным заболеванием (в пределах от 340 до 790 пг/мл при норме 42,8 пг/мл). По мере увеличения частоты рецидивов, продолжительности заболевания, базисной терапии уровень цитокинов снижался (в среднем от 110 до 224 пг/мл). Минимальный уровень их выявлен у больных, длительно лечившихся кортикостероидами и цитостатиками. Системная однократная пересадка МСК у них вызывала достоверное повышение изначально сниженного уровня цитокинов в среднем с 11,4 до 23,6 пг/мл, в то же время трансплантация МСК у больных в остром периоде вызывала достоверное снижение уровня провоспалительных цитокинов. Через 6 и 12 месяцев после введения МСК отмечается достоверный рост противовоспалительных цитокинов ТФР-1β, ИЛ-4, ИЛ-10 и снижение провоспалительных цитокинов ИНФ-γ, α-ФНО, ИЛ-1β, что свидетельствует о регуляторных свойствах МСК и готовности их к индукции восстановительных (репаративных) процессов *(рис. 5)*.

Содержание иммуноглобулинов в среднем в сыворотке крови больных ЯК до введения МСК и спустя 2, 6 и 12 месяцев соответственно составило: IgG — 11,2 – 14,6 – 14,8 и 14,8 г/л; IgM — 0,9 – 1,6 – 2,18 – 2,3 г/л; IgA — 1,82 – 2,6 – 3,2 и 3,8 г/л (в контроле — IgM — 1,6, IgG — 11,3; IgA — 2,3 г/л) ($p < 0,05$). Наиболее существенно возрастала концентрация IgA ($p < 0,05$), опосредующего местный гуморальный иммунный ответ. Мы проанализировали уровень иммуноглобулинов G, A, M в 2 группах больных в зависимости от эффекта проведенной трансплантации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга — у больных с выраженным положительным клиническим эффектом и у больных, у которых эффекта от введения МСК не было или он был непродолжительным. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови до введения МСК в группе больных, где трансплантация оказала положительный эффект ($n = 32$), составило: IgM — 1,5 ± 0,04 г/л, IgG — 12,5 ± 0,71 г/л, IgA — 2,2 ± 0,8 г/л. В группе больных ($n = 12$), где эффект был непродолжительный, исходный уровень иммуноглобулинов составил: IgG — 8,8 ± 0,9 г/л, IgM — 1,3 ± 0,01, г/л, IgA — 0,9 ± 0,01 г/л ($p < 0,05$). Динамика показателей гуморального иммунитета и цитокинового статуса через 2 месяца после трансплантации также существенно отличалась в этих двух группах. В группе больных ($n = 12$), где эффект был непродолжительный, уровень

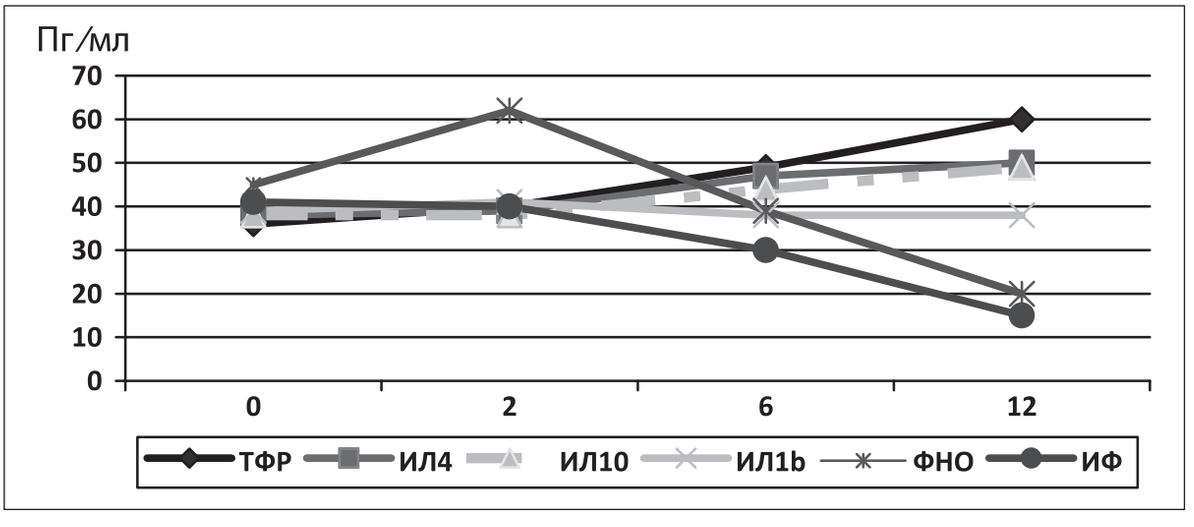

Рис. 5. *Динамика про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови после трансплантации МСК*

иммуноглобулинов составил: IgG — 7,3 ± 0,2 г/л, IgM — 1,4 ± 0,01, г/л, IgA — 1,0 ± 0,01 г/л ($p < 0,05$), в группе с положительным эффектом ($n = 30$) IgG — 18,5 ± 0,9 г/л, IgM — 2,5 ± 0,1 г/л, IgA — 2,1 ± 0,8 г/л.

Данные изменения подтверждают концепцию о том, что трансплантация МСК наиболее эффективна на ранних стадиях заболевания, а не в более поздние сроки, когда собственные иммунные резервы организма истощены и прогрессированием аутоиммунного процесса, и длительным приемом иммуносупрессоров.

Ведущая роль в развитии и течении ВЗК принадлежит аутоиммунным реакциям. Так, у больных ЯК, как правило, повышается сывороточная концентрация циркулирующих аутоантител к различным антигенным структурам цитоплазмы нейтрофилов. Она отражает интенсивность аутоиммунных воспалительных процессов и, следовательно, имеет важное диагностическое и прогностическое значение.

Согласно нашим данным, при ЯК преобладала повышенная циркуляция (18 – 92 ед/мл, в контроле — 10 ед/мл) аутоантител иммуноглобулина (Ig) G к антигенам цитоплазмы нейтрофилов — протеиназе, лактоферрину, миелопероксидазе, BPI, реже — к эластазе нейтрофилов. Системное введение МСК вызывало снижение изначально повышенной концентрации аутоантител к нейтрофилам (IgG-BPI) в среднем от 42,6 до 12,4 ед/мл, что подтверждало снижение активности воспалительного процесса в кишечнике, в то время как стандартная терапия не влияла на уровень аутоантител к нейтрофилам, в течение 12 месяцев наблюдения их концентрация сохранялась на уровне 38,4 – 42,2 ед/мл.

Благодаря фундаментальным исследованиям по биологии и иммунологии процессов адаптации, пролиферации и их нарушений [60] была открыта способность органов и тканей к регенерации. Кроме того, идентифицированы многие биологически активные молекулы (тропные факторы), которые, будучи компонентами иммунной системы, участвуют в процессе регенерации и осуществляют тонкую регуляцию восстановительных процессов в измененных тканях в комплексе с нервной и эндокринной системами организма.

В условиях хронического воспалительного процесса во всех органах иммунной системы (костный мозг, тимус, селезенка) наступают глубокие морфофункциональные изменения, которые характеризуются развитием вторичного иммунодефицитного состояния с ослаблением клеточного и гуморального иммунитета, цитокиновым дисбалансом, перераспределением иммунных клеток в организме и нарушением их информационной и миграционной активности. Дисбаланс в системе иммунной регуляции ведет к нарушению морфорегуляторных функций лимфоидной ткани, следствием чего является нарушение процессов регенерации [45]. В работах НИИ трансплантологии и искусственных органов было показано, что под влиянием МСК происходит стимуляция Т-зон тимуса, а также Т- и В-зон селезенки, восстановление их структуры и функции. Отражением этого является нормализация цитокинового баланса и активизация процессов репаративной регенерации паренхиматозных тканей [46].

Таким образом, введение МСК стимулирует угнетенный синтез цитокинов, впоследствии снижая уровень провоспалительных цитокинов и повышая рост противовоспалительных цитокинов, снижает интенсивность иммунопатологических процессов при ЯК, что одновременно сочетается с позитивной динамикой клинической и эндоскопической картины заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Безусловно, изложенные в настоящей работе результаты можно назвать пока предварительными, они требуют обсуждения, дальнейшего накопления и изучения, но они вселяют оптимизм и поэтому исследование влияния трансплантированных МСК костного мозга на течение язвенного колита должно быть продолжено. На основании полученных результатов уже можно сделать определенные выводы.

Трансплантация аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга показана пациентам с умеренной и высокой активностью процесса на ранних стадиях заболевания, а не в поздние сроки, когда присутствуют необратимые изменения в тканях и органах и угнетение иммунного потенциала организма. Имплантированные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга способствуют снижению индекса клинической и эндоскопической активности воспалительного процесса при язвенном колите, а также способствуют заживлению слизистой оболочки толстой кишки и приводит к снижению индекса Гебса.

Введение аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга снижает риск развития рецидива на 60% у больных с хроническим рецидивирующим и непрерывным течением язвенного колита, увеличивает продолжительность ремиссии и уменьшает частоту госпитализаций больных язвенным колитом до 20,5%.

Системная трансплантация аллогенных МСК оказывает разнонаправленный регулирующий эффект на воспалительный процесс: стимулирует функциональную активность угнетенной иммунной системы, увеличивая уровень изначально сниженных иммуноглобулинов, а также про– и противовоспалительных цитокинов α-ФНО и ИНФ-γ, ИЛ-1. В динамике МСК повышает уровень противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10; снижает интенсивность аутоиммунных реакций и активность иммунопатологических процессов, снижая в течение 12 месяцев увеличенное содержание аутоантител к антигенам цитоплазмы нейтрофилов (IgG-BPI). Трансплантация аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга способствует

повышению эффективности комплексной противовоспалительной терапии ВЗК.

Использование клеточной культуры МСК, выращенной из костного мозга человека, в лечении больных ВЗК не приводит к возникновению острых нежелательных реакций и не приводит к развитию опухолевого процесса, что подтверждается регулярными эндоскопическими исследованиями с проведением множественных биопсий и нормальным уровнем онкомаркеров СА 242 и СА19–9.

Таким образом, трансплантация МСК является безопасным и эффективным методом лечения и может использоваться в комплексной терапии больных ВЗК. Поскольку стволовые клетки костного мозга могут быть получены в достаточном количестве путем повторной аспирации костного мозга, а их количество можно увеличивать *in vitro* и при этом не требуется иммуносупрессии после их трансплантации, данный подход к лечению воспалительных заболеваний кишечника имеет большие перспективы для клинического использования.

Но, несмотря на то что трансплантация МСК сулит большие обещания, будущее данного метода терапии целиком зависит от проведения надежно контролируемых, рандомизированных клинических исследований. Необходимо продолжить исследование с целью определения кратности и частоты введения клеток для достижения наиболее оптимального эффекта в лечении больных с язвенным колитом.

СОКРАЩЕНИЯ:

BPI — аутоантитела к нейтрофилам
α-ФНО — α-фактор некроза опухоли
ВЗК — воспалительные заболевания кишечника
ИГ — иммуноглобулин
ИЛ — интерлейкин
ИФ-γ — интерферон-γ
МСК — мезенхимальные стромальные клетки
СОТК — слизистая оболочка толстой кишки
ЯК — язвенный колит

ЛИТЕРАТУРА

1. *Парфенов А. И.* Основные направления и перспективы лечения воспалительных заболеваний кишечника (передовая) // Тер. арх. — 2007. — Т. 8. — С. 5 – 8.

2. *Кушнир И. Э.* Вопросы клинической картины и основные методы диагностики воспалительных заболеваний кишечника. — Киев, 2005.

3. *Moum B., Ecbom A., Vatn M. H. et al.* Clinical course during the 1st year after diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Results of a large prospective population-based study in southeastern. Norway 1990 – 1993 // Scand. J. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 32. — P. 105 – 112.

4. *Faubion W. A., Loftus E. V., Harmsen W. S. et al.* The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population based study // Gastroenterology. — 2001. — Vol. 121. — P. 255 – 260

5. *Targan S. R., Hanauer S. B., van Deventer S. J. et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group // N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 337. — P. 1029 – 1035.

6. *Hanauer S. B., Kamm M. A., Colombel J. F. et al.* Sustained steroid-free clinical remission in patients with moderate to severe Crohn´s disease treated with adalimumab // Am. J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 101. — S. 460 (Abstract 1181).

7. *Hanauer S. B., Sandborn W. J., Rutgeerts P. et al.* Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn´s disease: The Classic-I Trial // Gastroenterology. — 2006. — Vol. 130. — P. 323 – 332.

8. *Sandborn W. J.* Clinical perspectives in Crohn's disease. Moving forward with anti-TNF-alpha therapy: current needs and future treatments // Rev. Gastroenterol. Disord. — 2007. — Vol. 7, Suppl. 2. — S. 23 — S35.

9. *Hanauer S. B., Feagan B. G., Lichtenstein G. R. et al.* Maintenance infliximab for Crohn´s disease: The Accent I randomised trial // Lancet. — 2002. — Vol. 359. — P. 1541 – 1549.

10. *Hanauer et al.,* 2002; *Sandborn W. J., Rutgeerts P., Enns R. et al.* Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: A randomized trial // Ann. Intern. Med. — 2007. — Vol. 146. — P. 829 – 838; Colombel et al. 2007; Schreiber S. et al. 2007.

11. *Bosani M., Ardizzone S., Porro G. B.* Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases, University Hospital. — Milan, Italy, Biologics: Targets & Therapy, 2009. — Vol. 3. — P. 77 – 97.

12. Wayne Dryden University of Louisville, Overview of stem cell therapy for Crohn's disease, Division of Gastroenterology, Department of Medicine Gerald, USA // Expert Opin. Biol. Ther. — 2009. — Vol. 9, № 7. — P. 841 – 847.

13. *Nelson T. J., Behfar A., Terzic A.* Strategies for therapeutic repair: The «R3» regenerative medicine paradigm, Marriott Heart Disease Research Program, Division of cardiovascular diseases, Departments of medicine, molecular pharmacology and experimental therapeutics, and medical genetics, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA // Clin. Transl. Sci. — 2008. — Vol. 1 (2. — P. 168 – 171. doi: 10.1111/j. 1752 – 8062.2008.00039.

14. *Шумаков В. И., Скалецкий Н. Н.* Трансплантация островковых и других эндокринных клеток. // Трансплантология. Руководство/Под ред. В. И. Шумакова. — М.: Медицина; Тула: Репроникс Лтд., 1995. — С. 317 – 331.

15. *Friedenstein A. J., Gorskaja U. F., Kulagina N. N.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // Exp. Hematol. — 1976. — Vol. 4, № 5. — P. 267 – 274.

16. *Caplan A. I.* Mesenchymal stem cells // J. Orthotop. Res. — 1991. — Vol. 9, № 5. — P. 641 – 650.

17. *Friedenstein A. J., Chailikhyan R. K., Gerasimov U. V.* Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers // Cell Tissue Kinet. — 1987. — Vol. 20, № 3. — P. 263 – 272.

18. *Friedenstein A. J., Piatetzky S., Petrakova K.* Osteogenesis in transplants of bone marrow cells // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1966. — Vol. 16. — P. 381 – 390.

19. *Wakitani S., Saito T., Caplan A. I.* Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine // Muscle Nerve. — 1995. — Vol. 18, № 12. — P. 1417 – 1426.

20. *Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* // J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103. — P. 697 – 705.

21. *Шумаков В. И., Казаков Э. Н., Онищенко Н. А. и др.* Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда // Рос. кардиол. журн. — 2003. — Т. 5. — С. 42 – 50.

22. *Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B. et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro* // Stem Cells. — 2004. — Vol. 22. — P. 377 – 384.

23. *Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J. et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // J. Neurosci. Res. — 2000. — Vol. 61. — P. 364 – 370.

24. *Matsumoto T., Okamoto R., Yajima et al.* Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine // Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128. — P. 1851 – 1867.

25. *Semont A., Francois S., Mouiseddine M. et al.* Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury // Adv. Exp. Med. Biol. — 2006. — Vol. 585. — P. 19 – 30.

26. *Majumdar M. X., Keane-Mooze M., Buyaner D. et al.* Characterization 5id functionality of cells surface molecules on human mesenchymal stem cell // J. 5 omed. Sci. — 2003. — Vol. 10. — P. 228 – 241.

27. *Sotiropoulou P. A., Perez S. A., Gritzapis A. D. et al.* Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24, № 1. — P. 74 – 85.

28. *Spaggiari G. M., Capobianco A., Becchetti S. et al.* Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation // Blood. — 2006. — Vol. 107, № 4. — P. 1484 – 1490.

29. *Aggarwal S., Pittinger M. F.* Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. — 2005. — Vol. 105, № 4. — P. 1815 – 1822.

30. *Jayne D., Passweg J., Marmont A. et al.* European group for blood and marrow transplantation; European league against rheumatism registry. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus // Lupus. — 2004. — Vol. 13, № 3. — P. 168 – 176.

31. *Tyndall A., Matucci-Cerinic M.* Haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of systemic sclerosis and other autoimmune disorders // Expert Opin. Biol. Ther. — 2003. — Vol. 3, № 7. — P. 1041 – 1049.

32. *Snowden J. A., Passweg J., Moore J. J. et al.* Autologous hemopoietic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: a report from the EBMT and ABMTR // J. Rheumatol. — 2004. — Vol. 31, № 3. — P. 482 – 488.

33. *Stasi R., Provan D.* Management of immune thrombocytopenic purpura in adults // Mayo Clin. Proc. — 2004. — Vol. 79, № 4. — P. 504 – 522.

34. *Popat U., Krance R.* Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disorders: the American perspective // Br. J. Haematol. — 2004. — Vol. 126, № 5. — P. 637 – 649.

35. *Drakos P. E., Nagler A., Or R.* Case of Crohn's disease in bone marrow transplantation // Am. J. Hematol. — 1993. — Vol. 43. — P. 157 – 158.

36. *Duijvestein M., Verwey M. H., Fidder H. H. et al.* Autologous mesenchymal stem cell therapy in patients with refractory Crohn's disease // J. Crohns Colitis. — 2009. — Vol. 3, № 1. — S. 46 – 47.

37. *Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Herreros D. et al.* A Phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fi stula by adipose mesenchymal stem cell transplantation // Dis. Colon. Rectum. — 2005. — Vol. 48, № 7. — P. 1416 – 1423.

38. *Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual I. et al.* Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fi stula: a Phase II clinical trial // Dis. Colon. Rectum. — 2009. — Vol. 52, № 1. — P. 79 – 86.

39. *Hawkey C. J.* Stem cell transplantation for Crohn's disease // Best Pract. Res. Clin. Haematol. — 2004. — Vol. 17, № 2. — P. 317 – 325.

40. *Oyama Y., Craig R. M., Traynor A. E. et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease // Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128, № 3. — P. 552 – 563.

41. *Geboes K., Riddel R., Jensfelt B. et al.* A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis // Gut. — 2000. — Vol. 47. — P. 404 – 409.

42. Harvey Motulsky «Intuitive Biostatistics». — Oxford Univer Press, USA, 1995. — 408 c., Introduction to biostatistics: Textbook. — Vienna School 01 Clin. Research, 2009.

43. *Kaplan E. I., Meier P.* Nonparametric estimation from incomplete observations // J. Am. Stat. Assoc. — 1958. — Vol. 53. — P. 457.

44. *Цыб А. Ф., Коноплянников А. Г., Колесникова А. И. и др.* Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека // Вестн. РАМН. 2004. — Т. 59, № 9. — С. 71 – 76.

45. *Бабаева А. Г.* Роль иммунной системы в дизрегуляции морфогенетических процессов // Дизрегуляционная патология; под ред. Г. Н. Крыжановского. — М.: Медицина, 2002. — С. 366 – 385.

46. *Аскаров М. Б., Онищенко Н. А., Макарова О. В.* Восстановление морфофункционального состояния органов иммуногенеза и течение длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка при трансплантации культивированных клеток аутогенного костного мозга // Клеточная трансплант. и тканевая инженерия. — 2008. — Т. 3. — С. 36 – 42.