

## КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

### Эффективность и безопасность применения мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у больных с рефрактерными формами болезни Крона

О.В. Князев<sup>1</sup>, А.И. Парфенов<sup>1</sup>, П.Л. Щербаков<sup>1</sup>, С.Г. Хомерики<sup>1</sup>,  
И.Н. Ручкина<sup>1</sup>, А.Г. Конопляников<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, Москва

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр, Обнинск

#### Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells of bone marrow in patients with refractory forms Crohn's disease

O.V. Knyazev<sup>1</sup>, A.I. Parfenov<sup>1</sup>, P.L. Shcherbakov<sup>1</sup>, I.N. Ruchkina<sup>1</sup>, S.G. Khomeriki<sup>1</sup>, A.G. Konoplyannikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute of Gastroenterology, Moscow

<sup>2</sup>Medical Radiological Research Center, Obninsk

Целью нашей работы являлась оценка среднесрочной эффективности и безопасности биологической терапии болезни Крона в виде трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга и антицитокиновой терапии селективными иммунодепрессантами.

Пациенты с болезнью Крона (с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением) были разделены на две группы, сопоставимые по полу, возрасту, длительности заболевания. Больным первой группы (n = 30) вводились ММСК дважды с интервалом 1 нед., а затем каждые 6 мес. по той же схеме; пациенты второй группы (n = 20) получали Инфликсимаб (ИНФ) по схеме 0-2-6 (индукционная терапия), затем каждые 8 нед. (поддерживающая терапия) в течение не менее года.

Было установлено, что оба метода биологической терапии рефрактерных форм болезни Крона позволяют достичь клинической и, в некоторых случаях, эндоскопической ремиссии. Сохранение клинической ремиссии достигалось в большинстве случаев без использования стероидных препаратов. Таким образом, оба метода биологической терапии сопоставимы по конечному результату. За 48 мес. наблюдения при использовании ММСК не было зарегистрировано ни одного случая летального исхода, процессов злокачественной трансформации по данным эндоскопических исследований или повышения уровня онкомаркеров.

Трансплантация аллогенных ММСК костного мозга может рассматриваться как перспективный и безопасный метод терапии рефрактерных форм болезни Крона, сопоставимый с терапией Инфликсимабом.

**Ключевые слова:** болезнь Крона, биологическая терапия, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, Инфликсимаб.

Болезнь Крона (БК) — хроническое неспецифическое гранулематозное воспаление желудочно-кишечного тракта, которое может поражать любые его отделы — от полости рта и до прямой кишки — с преимущественной локализацией патологического процесса в терминальном отрезке подвздошной кишки или в подвздошной и толстой кишке одновременно (илеocolит). Заболевание характеризуется

The aim of our study was to assess the safety and medium-term efficacy of biological therapy of Crohn's disease — the transplantation of allogeneic bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) and anticytokine therapy with selective immunosuppressants.

All patients with Crohn's disease (chronic continuous and chronic relapsing disease) were divided into two groups depending on the method of therapy: group 1 patients (n = 30) who that mesenchymal stromal cells (MSCs) were administered twice a month at intervals of 1 week, and then every 6 months Group 2 patients (n = 20) received infliximab (inflation) by the scheme 0-2-6 (induction therapy), then every 8 weeks (maintenance therapy) for at least the year. The age of patients in all groups ranged from 19 to 56 years (median (Me) — 36 years), the majority of patients were women — 28 (56.0%). Disease duration ranged from 3 to 15 years (Me — 5 years). Date of administration or cell culture is a point of inclusion in a clinical study.

In analyzing the results, it was found that both methods of biological therapy refractory forms of CD can achieve clinical and, in some cases, endoscopic remission. Preservation of clinical remission is achieved in most cases without steroids. Thus, both methods are comparable biological therapy on outcome.

Transplantation of bone marrow MSCs can be considered as a promising and safety method for treatment of refractory Crohn's disease, comparable to treatment with infliximab.

**Key words:** Crohn's disease, biological therapy, inflammatory bowel disease, infliximab, mesenchymal stromal cells.

трансмуральным воспалением, лимфаденитом, образованием язв и рубцов кишечной стенки и относится к хроническим воспалительным заболеваниям кишечника неизвестной этиологии.

БК впервые была описана в 1932 г. американским гастроэнтерологом Баррилом Бернардом Кроном и двумя его коллегами — Л. Гинзбургом и Г.Д. Оппенгеймером [1]. Среди причин БК в первую

e-mail: oleg7@bk.ru

очередь рассматривают наследственные (генетические), инфекционные и иммунологические факторы. Актуальность данной патологии предопределена не только неясной этиологией, но и сложностью патогенеза, рецидивирующим характером течения, непредсказуемым эффектом от проводимой терапии, опасными для жизни осложнениями и инвалидизацией больных [2].

Патогенез воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), к которым относятся БК и язвенный колит (ЯК), обусловлен сложными взаимодействиями генетических, экологических, микробных и иммунных факторов. Возможность найти новые методы терапии ВЗК может дать только комплексный подход к изучению патогенеза данных заболеваний с позиций различных дисциплин, таких как молекулярная микробиология, иммунология, иммунофизиология, нейроиммунология, генетика.

Накоплено множество доказательств, указывающих на аутоиммунные нарушения как на существенный компонент механизма воспаления и разрушения тканей при данной патологии [3]. Наиболее перспективным направлением в исследовании патогенеза воспалительных заболеваний кишечника и создании новой стратегии их лечения считается изучение цитокинов, которые являются новыми мишенями для современной биологической терапии. Современная концепция лечения аутоиммунных заболеваний основана на раннем подавлении иммуновоспалительного процесса, что достигается назначением системных иммуносупрессоров.

Многолетними и многочисленными исследованиями было установлено, что глюкокортикостероиды (ГКС) являются эффективными в индукции ремиссии при ВЗК [4]. Наиболее серьезная проблема в лечении ВЗК – гормональная зависимость и резистентность, которая формируется уже после первого курса терапии ГКС у 20–35 % больных с тяжелым течением БК [5]. Часто признаки гормональной резистентности и гормональной зависимости наблюдаются одновременно [6]. Длительная терапия ГКС часто приводит к развитию осложнений (вторичная надпочечниковая и гипоталамо-гипофизарная недостаточность, синдром Иценко – Кушинга, нарушение менструального цикла, гипергликемия, задняя субкапсулярная катаракта, потеря мышечной массы, остеопороз, асептический некроз головок бедренной и плечевой костей и пр.). Из вышеизложенного следует, что одной из целей терапии БК является отказ от ГКС.

Данные проблемы потребовали разработки новых терапевтических направлений в лечении пациентов с БК. Прогресс в изучении молекулярных мишеней воспаления при БК способствовал серьезному успеху – появлению и развитию антицитокиновой или биологической терапии. Разработанные генно-инженерные биологические препараты явились значительным прорывом в лечении БК. В настоящее время в отечественную клиническую практику внедрен рекомбинантный препарат Инфликсимаб (ИНФ), представляющий собой химерные мышинные моноклональные антитела к ФНО- $\alpha$ , соединенные с человеческим иммуноглобулином G1 (IgG1k). Инфликсимаб избирательно связывает человеческий ФНО- $\alpha$ , обладая очень высокой афинностью не только к растворимому ФНО-тримеру, но и блокируя мембраносвязанный ФНО- $\alpha$  [7]. Накопленный в мировой медицине опыт показал, что моноклональные анти-

тела – ингибиторы провоспалительных цитокинов – способны быстро купировать рецидив, обеспечивать длительную ремиссию и уменьшить потребность в гормонах у значительного числа больных гормонорезистентной и гормонозависимой формами БК и ЯК [8].

Показания к применению моноклональных антител в лечении БК расширяются, и у них есть несомненные преимущества перед системными иммунодепрессантами. Больные БК в долгосрочной перспективе могут получать препараты, поддерживающие ремиссию заболевания, обеспечивая тем самым полноценное качество жизни. Но, несмотря на очевидные достижения в лечении БК, проблема фармакотерапии остается до конца нерешенной, около 30% больных нуждаются в проведении альтернативной биологической терапии, примерно 20–40% пациентов требуется хирургическое вмешательство, так же не избавляющее многих пациентов от последующих рецидивов [9].

В настоящее время для лечения БК используется несколько биологических препаратов, однако большинство из них, к сожалению, являются дорогостоящими и токсичными. Установлено, что до одной четверти больных БК не отвечают на антицитокиновую терапию (первичная неэффективность). У части больных, регулярно получающих поддерживающую терапию анти-ФНО- $\alpha$  препаратами, в последующем развивается его вторичная неэффективность. Клинические испытания биологических препаратов Daclizumab, Visilizumab, Etanercept были приостановлены либо из-за выраженной токсичности и развития серьезных осложнений, либо ввиду отсутствия достоверной разницы в их эффективности по сравнению с плацебо в двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях. Таким образом, в проведении альтернативной биологической терапии нуждаются примерно 30% больных БК [9], что обуславливает актуальность разработки новых терапевтических подходов.

Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии, стала возможной разработка новых способов лечения с использованием различных типов стволовых и прогениторных клеток, сформировавшееся направление получило название «регенеративная медицина».

Регенеративная медицина является одним из стратегических направлений развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 г. В настоящее время ни одна инновационная область медицинской науки не привлекает столь же пристального внимания. Продукты клеточных технологий представляют собой новый класс препаратов, стремительно развивающийся в последние годы [10]. Целью клеточной терапии является замещение, восстановление и обновление поврежденных клеток и тканей, воссоздание их функции путем непосредственной дифференцировки введенных клеток, продукции ими биологически активных факторов и (или) за счет активации эндогенных резидентных прогениторных клеток. Успех высокодозной иммуносупрессивной терапии с трансплантацией аутогенных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) при системной красной волчанке, рассеянном склерозе, ревматоидном артрите, апластической анемии, аутоиммунной тромбоцитопении и ряде дру-

гих аутоиммунных заболеваний привел к тому, что в ведущих медицинских центрах Европы и США в конце 90-х годов прошлого века были начаты пилотные исследования эффективности и безопасности клеточной терапии у больных БК [11].

Клеточная трансплантация рассматривается как дополнительный либо самостоятельный способ коррекции функциональной несостоятельности некоторых органов и тканей. В терапии БК особого внимания заслуживают ММСК, которые являются «гипоиммунными» и могут применяться для трансплантации в аллогенном варианте, что может быть более предпочтительно при аутоиммунных заболеваниях, так как ММСК собственного организма не всегда способны купировать иммунопатологический процесс [12]. Клетки, мигрируя в область воспаления по хемотаксическому градиенту [13], выделяют вещества, ингибирующие продукцию провоспалительных цитокинов, подавляют пролиферацию Т-клеток, что приводит к восстановлению иммунного равновесия [14]. ММСК обеспечивают супрессивное микроокружение путем продукции простагландинов и интерлейкина-10 [15], которые и создают иммуносупрессивную среду в ткани, подвергшейся иммунной агрессии [16]. ММСК могут также ингибировать некоторые функции В-, NK- и дендритных клеток. Первое сообщение об успешной аллогенной трансплантации костного мозга больному БК по поводу лимфомы относится к 1993 г. [17]. Последнее десятилетие трансплантация ММСК рассматривается как потенциально новое стратегическое направление в терапии аутоиммунных заболеваний, в том числе БК [18].

Целью нашей работы являлась сравнительная оценка среднесрочной эффективности и безопасности двух методов биологической терапии БК: трансплантации аллогенных ММСК костного мозга и антицитокиновой (анти-ФНО- $\alpha$ ) терапии селективными иммунодепрессантами.

### Материал и методы

С 2008 г. в отделе патологии кишечника ЦНИИ гастроэнтерологии впервые в нашей стране проводится системная трансплантация ММСК костного мозга больным БК в рамках комплексной целевой научной программы Центрального научно-исследовательского института гастроэнтерологии «Совершенствование методов диагностики и лечения болезней органов пищеварения», а также в рамках программы «Клеточные технологии — медицине», утвержденной президентом РАМН. Ученым Советом ЦНИИ гастроэнтерологии утвержден «Протокол ограниченных клинических испытаний метода системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека у больных язвенным колитом и болезнью Крона», согласованный с локальным этическим комитетом института. Все больные подписали форму информированного согласия на проведение данного метода лечения и режима обследования.

В исследование включали пациентов мужского и женского пола в возрасте от 18 до 69 лет с хроническим рецидивирующим и хроническим непрерывным течением БК, которые имели достоверный диагноз, подтвержденный эндоскопически и гистологически. Пациентам объясняли цели исследования, а также возможные риски участия в нем.

Критериями невключения являлись:

- обнаружении поверхностного антигена к вирусу гепатита В (HBV), антител к вирусу гепатита С (HCV), положительной реакции на ВИЧ, RW;
- наличие в анамнезе лимфопролиферативных заболеваний или злокачественных опухолей любой локализации;
- необходимость срочного хирургического вмешательства по поводу желудочно-кишечного кровотечения, перитонита, кишечной непроходимости, интраабдоминального абсцесса, требующего дренирования хирургическим способом;
- сопутствующие инфекционные заболевания;
- положительная кожная проба на туберкулез или признаки туберкулеза по результатам рентгенографии грудной клетки;
- признаки или симптомы почечной (креатинин  $\geq 250$  ммоль/л), печеночной (билирубин  $\geq 25$  мкмоль/л) недостаточности;
- сердечная или дыхательная недостаточность средней или тяжелой степени;
- беременность и лактация;
- психические нарушения, алкогольная или наркотическая зависимость, а также любые прочие нарушения, которые негативно влияли на способность адекватно понимать и давать письменное информированное согласие на участие в клиническом исследовании.

Были сформированы две группы больных БК средней степени тяжести с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением заболевания. Пациентам 1 группы ( $n = 30$ ) аллогенные ММСК вводились дважды в течение месяца с интервалом 1 нед., а затем через 3 и 6 мес. от момента первого введения культуры клеток. Во 2 группе ( $n = 20$ ) больные получали ИНФ по схеме 0-2-6 нед. (индукционная терапия), затем каждые 8 нед. (поддерживающая терапия) в течение не менее 12 мес. Пациенты обеих групп получали также средства стандартного лечения.

Возраст больных во всех группах составлял от 19 до 56 лет (медиана (Me) — 36 лет), большинство больных ( $n = 28$ , 56%) — женщины. Продолжительность болезни составляла от 3 до 15 лет (Me — 5 лет). Существенных различий в группах больных по демографическим показателям не было. Дата введения препарата или культуры клеток являлась точкой включения в клиническое исследование.

Больным первой группы за 3 сут. до введения ММСК отменяли системные иммунодепрессанты (азатиоприн), снижали дозу кортикостероидов до 15–20 мг/сут., дозу аminosалицилатов оставляли на уровне 2,0 г в сут. После трансплантации ММСК дозу ранее назначенных ГКС (не более 30 мг/сут.) постепенно снижали в течение 4–6 нед. до полной отмены, если был получен ответ на терапию (снижение индекса активности БК не менее чем на 100 баллов). В дальнейшем, при отсутствии рецидива заболевания, больные получали поддерживающую терапию препаратами 5-аминсалициловой кислоты (5-АСК).

Вторая группа больных получала комбинированную терапию ИНФ + иммуномодуляторы (азатиоприн 2,5 мг/кг/сут), т.е. больные получали оптимальную биологическую терапию в соответствии с международными рекомендациями ECCO (The European Crohn's and Colitis Organization).

Клиническую активность БК оценивали в баллах с помощью индекса активности БК (ИАБК) [19]. Как и в большинстве клинических исследований, у больных с активной БК нами также учитывался уровень С-реактивного белка (СРБ) (выше 10 мг/л). Всем больным проводили общеклинические и биохимические анализы крови, мочи и кала. Эндоскопическое исследование проводили на видеосистеме фирмы Фуджинон EVE W-88A. Оценку гистологических препаратов БК осуществляли по шкале Гебса.

Критерием эффективности терапии у больных БК с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением является безрецидивное течение заболевания в течение 12 мес. (ИАБК менее 150 баллов), в соответствии с рекомендациями ЕССО [20], а также снижение ИАБК на 100 баллов от исходного значения.

Контроль за динамикой клинических симптомов, лабораторных показателей, эндоскопической и патогистологической картины осуществляли через 2 и 6 мес. в течение первого года наблюдения, затем ежегодно, при отсутствии симптомов рецидива заболевания. Для количественной оценки использовали средние величины указанных выше ИАБК и патогистологической активности Гебса. Клиническое наблюдение за больными продолжалось в зависимости от даты введения ММСК в сроки от 12 до 58 мес.

#### Получение ММСК

Подробная методика получения и экспансии ММСК в необходимом для системной трансплантации количестве (150–200 млн клеток) опубликована ранее [21]. Метод разрешен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (лицензия ФС-2006/2006). Клетки костного мозга (0,5–1 мл) получали путем пункции грудины или гребня подвздошной кости здорового донора под местным обезболиванием в строго стерильных условиях, которые соблюдали в процессе всей дальнейшей работы с клетками в культуральном боксе. Донор перед процедурой подписывал «Приложение к заявлению о согласии участвовать в качестве донора костного мозга в проводимых в ГУ МРНЦ МЗиСР медицинских исследованиях по созданию культуры кардиомиоцитов из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и дальнейшему использованию культуры клеток в научных целях».

#### Трансплантация аллогенных ММСК

Культуру ММСК вводили капельно в/в в дозе 1,5–2 млн клеток на 1 кг массы тела. Для осуществления системной трансплантации 130–160 млн аллогенных ММСК, экспансированных *in vitro*, клетки взвешивались в 200 мл стерильного физиологического раствора, содержащего гепарин в концентрации 50 Ед/мл, и через капельницу вводились пациенту в течение 40–60 мин.

#### Оценка безопасности и эффективности

Безопасность трансплантации аллогенных ММСК костного мозга в комплексной терапии у больных БК мы оценивали по результатам ежегодных контрольных эндоскопических исследований кишки с множественной лестничной биопсией. В сыворотке крови больных иммуноферментным методом определяли уровни онкомаркеров СА 242, СА 19-

9, раково-эмбрионального антигена (РЭА), а также трансформирующего фактора роста-1 $\beta$  (ТФР-1 $\beta$ ) с помощью тест-систем ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург), Orgentec (Германия), Евроиммун (Франция).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики, статистическую значимость различий — с помощью критерия Стьюдента для сравнения двух величин. Для оценки продолжительности ремиссии использовался метод построения кривых выживаемости (метод Каплана и Майера), отражающих вероятность пережить определенное время без отрицательного события, в нашем случае — без рецидива заболевания. Точка начала отсчета — дата включения в исследование, точка окончания отсчета — дата последнего наблюдения, отрицательное событие — рецидив заболевания. Использовали пакет прикладных программ Microsoft® Office Excel 2003; Statistica 6.0.

#### Результаты и обсуждение

Исходно у 30 больных БК, которым была осуществлена трансплантация ММСК, ИАБК составил в среднем  $247,6 \pm 10,3$ , уровень СРБ —  $26,9 \pm 4,2$  мг/л. У 20 больных, которым проводилась терапия инфликсимабом (группа 2), среднее значение ИАБК —  $255,0 \pm 13,0$ , СРБ —  $27,5 \pm 3,7$  мг/л. Таким образом, при сравнении групп до начала терапии, различий в клиническом течении болезни и уровню СРБ не было ( $p > 0,05$ ). Больные обеих групп были также сопоставимы по возрасту, полу, длительности течения БК, а также ранее проводимой терапии.

Через 2 мес. после трансплантации аллогенных ММСК костного мозга у 21 пациента (70,0%), была достигнута полная клиническая ремиссия — диарея не более 2 раз в сут., стул оформленной консистенции, без патологических примесей, отмечалась прибавка массы тела, исчезновение болевого синдрома. Через 6 мес. из общего количества больных, достигших ремиссии заболевания, у 13 пациентов наблюдалась клиничко-эндоскопическая ремиссия (43,3%) — полное заживление слизистой оболочки толстой кишки. Через 12 мес. ремиссия, достигнутая в первые 2 мес. после введения ММСК, сохранялась у всех больных БК. Таким образом, эффективность клеточной терапии у больных БК с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением, согласно рекомендациям ЕССО, составила 70,0%.

За 24 мес. наблюдения ремиссия сохранилась у 16 больных (53,3%). Рецидив заболевания произошел у трех пациентов среди больных, достигших клинической ремиссии, а также еще у двух из тех, у кого ранее наблюдалась клиничко-эндоскопическая ремиссия. За 36 мес. наблюдения у 15 больных сохранялась ремиссия заболевания: у 7 — клиническая, а у 8 больных клиничко-эндоскопическая, т.е. безрецидивный период составил 50,0%. За 48 мес. рецидив заболевания произошел у 16 больных (53,3%), а ремиссия сохранялась у 14 пациентов (46,7%). В настоящий момент ремиссия БК сохраняется у 10 больных (33,3%), из которых в 5 случаях (16,6%) — клиничко-эндоскопическая.

Динамика ИАБК и уровня СРБ за период наблюдения в данной группе больных представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Динамика ИАБК у пациентов с болезнью Крона на протяжении 48 мес.

Группа	Исходное значение ИАБК (M±m) (баллы)	6 мес.	12 мес.	24 мес.	36 мес.	48 мес.
ММСК (n = 30)	247,6±10,3	70,45 ±8,6*	61,7 ±5,0*	65,3 ±8,1*	72,2±10,6 *	84,6±9,8 *
ИНФ (n = 20)	255,0±13,0	46,8 ±4,5*	59,3 ±15,2*	62,5 ±5,1*	67,2±5,5 *	78,2±6,5 *

Примечание: ИАБК – индекс активности болезни Крона; ММСК – группа с трансплантацией мультипотентных мезенхимных стромальных клеток; ИНФ – группа с терапией Инфликсимабом; \*p<0,05 при сравнении исходного значения с ИАБК через 6, 12, 24, 36 и 48 мес.

Таблица 2. Динамика уровня СРБ у пациентов болезнью Крона на протяжении 48 мес.

Группа	Исходный уровень СРБ (M±m) (мг/л)	6 мес.	12 мес.	24 мес.	36 мес.	48 мес.
ММСК (n = 30)	26,9±4,2	3,6±0,6*	4,8±0,7*	6,3±0,4*	7,0±0,6*	8,1±0,8*
ИНФ (n = 20)	27,5±3,7	4,3±0,3*	4,7±0,2*	6,0±0,4*	6,4±0,5*	7,2±0,75*

Примечание: СРБ – С-реактивный белок; ММСК – группа с трансплантацией мультипотентных мезенхимных стромальных клеток; ИНФ – группа с терапией Инфликсимабом; \*p<0,05 при сравнении исходного значения с ИАБК через 6, 12, 24, 36 и 48 мес.

Уже через два месяца от момента проведения клеточной терапии уровень ИАБК достоверно снизился с 247,6±10,3 до 70,45±8,6 баллов, продолжая снижаться до 61,7±5,0 баллов в течение 12 мес., однако, через 24 мес. постепенно происходило увеличение среднего значения до 65,3±8,1 баллов за счет рецидивов заболевания. Через 36 мес. среднее значение ИАБК составило 72,2±10,6 баллов, через 48 мес. – 84,6±9,8, что было обусловлено увеличением количества больных, у которых развился рецидив заболевания. Динамика индекса ИАБК коррелировала с динамикой СРБ (r = 0,68; p<0,001).

10 больных (33,3%) БК, которым осуществлена трансплантация ММСК, ранее получавшие ГКС (преднизолон), в настоящее время получают только препараты 5-АСК. Как указывалось выше, у 5 больных (16,6%) сохраняется клиничко-эндоскопическая ремиссия, у 5 (16,6%) – полная клиническая с частичной эндоскопической ремиссией.

После трансплантации ММСК у четверых больных (с илеоколитом и терминальным илеитом) ответа не было – сохранялась диарея, болевой синдром, повышенная температура тела, определялись внекишечные симптомы, анемия. У одного из них заболевание прогрессировало, осложнилось кишечной непроходимостью и пациенту была выполнена резекция терминального отдела тонкой кишки с наложением илеотрансверзоанастомоза. Другим больным назначен ИНФ и высокие дозы ГКС. У пяти пациентов было достигнуто клиническое улучшение (снижение ИАБК на 100 баллов), но в течение года произошел повторный рецидив БК, что обусловлено естественным течением заболевания и отсутствием эффекта от клеточной терапии.

Во второй группе у всех больных (n = 20) через 6 нед. после использования ИНФ была отмечена положительная динамика: уменьшение или исчезновение болевого синдрома, уменьшение частоты стула. Через 2 мес. боль в животе сохранялась только у 1 пациентки, стул не более 2–3 раз в сут. у 4 больных. ИАБК снизился к концу 2 мес. на 58–106 пунктов у 4 больных, и на 50 пунктов у 1 пациентки. Таким образом, у подавляющего большинства больных

в течение 2 мес. была достигнута положительная динамика. Через 14 и 24 нед. от начала терапии ИНФ у 4 больных ИАБК снизился до 150 и менее, у них же в течение года отмечалась ремиссия, поддерживаемая 5-АСК. В течение 12 мес. клиничко-эндоскопическая ремиссия сохранялась у 12 пациентов. За 24 мес. наблюдения ИАБК в данной группе больных достоверно снизился и сохраняется до настоящего времени на уровне 67,2±5,5 (p<0,001).

В течение четырех лет наблюдения за данной группой больных, ремиссия заболевания сохранилась у 13 больных (65,0%), а у 7 (35,0%) произошел рецидив БК, потребовавший повторного назначения больших доз ГКС, хирургического вмешательства, увеличения дозы ИНФ до 10 мг/кг массы тела или перевода на другой антицитокиновый препарат. Следует отметить, что ИАБК в группе больных, получавших ИНФ через 4 года наблюдения был достоверно ниже, чем в группе больных, получающих ММСК: 78,2±6,5 и 84,6±9,8 баллов соответственно (p = 0,014).

Гистологическое исследование слизистой оболочки толстой кишки при БК выявило выраженную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы лимфоидными клетками, толстостенные сосуды с явлениями васкулита. Инфильтрация распространялась как на слизистую, так и на серозную оболочку кишечной стенки (рис. 1). Благодаря биологической терапии БК достигнута одна из целей лечения заболевания – заживление слизистой оболочки кишки. Через 2 мес. после трансплантации ММСК отмечалось заживление глубоких язвенных дефектов слизистой кишки, свищей и уменьшение степени патогистологической активности воспаления (рис. 2). После терапии ИНФ также уменьшается лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки СОТК (рис. 4 А, Б).

Для оценки активности воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки мы использовали шкалу Гебса. До трансплантации ММСК в первой группе больных БК индекс Гебса составил 4,1±0,3; во второй – 4,6±0,16. Степень патогистологической активности БК у больных, лечившихся ИНФ, был выше, чем у больных, получивших ММСК.

Данное обстоятельство обусловлено отечественной традицией назначения селективных иммунодепрессантов у больных ВЗК по принципу *step up*. Через 2 мес. у пациентов первой группы индекс Гебса составил  $1,2 \pm 0,03$ , во 2-й группе –  $1,3 \pm 0,1$ . Через 12 мес. наблюдения индекс Гебса у больных, которым осуществлена трансплантация ММСК и которые по-

лучали терапию ИНФ, составил  $1,1 \pm 0,02$  и  $0,7 \pm 0,1$  соответственно. При сравнении эффективности заживления слизистой оболочки кишки было установлено, что биологическая терапия моноклональными антителами и комплексная терапия с применением ММСК наиболее эффективны и составляет в обоих случаях 55–60% ( $p = 0,98$ ).

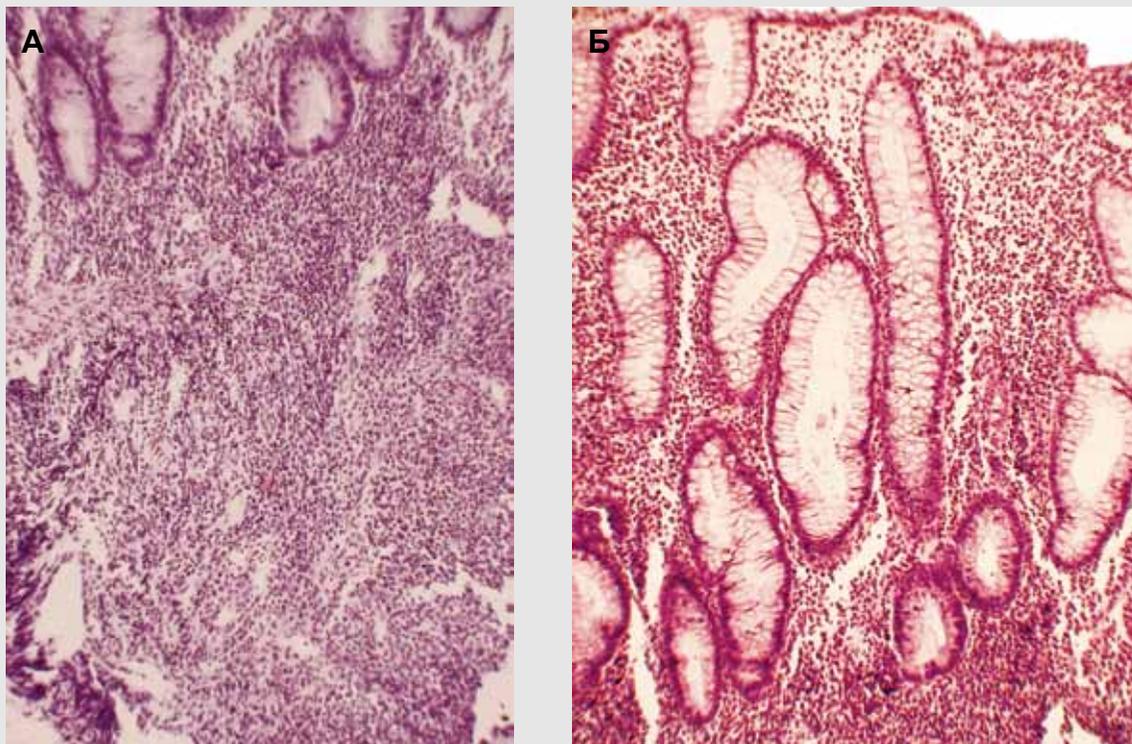


Рис. 1. Слизистая оболочка толстой кишки при болезни Крона: А – очаговая воспалительная инфильтрация до мышечной пластинки слизистой оболочки; Б – деформированные глубокие крипты с большим количеством бокаловидных клеток. Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.:  $\times 250$

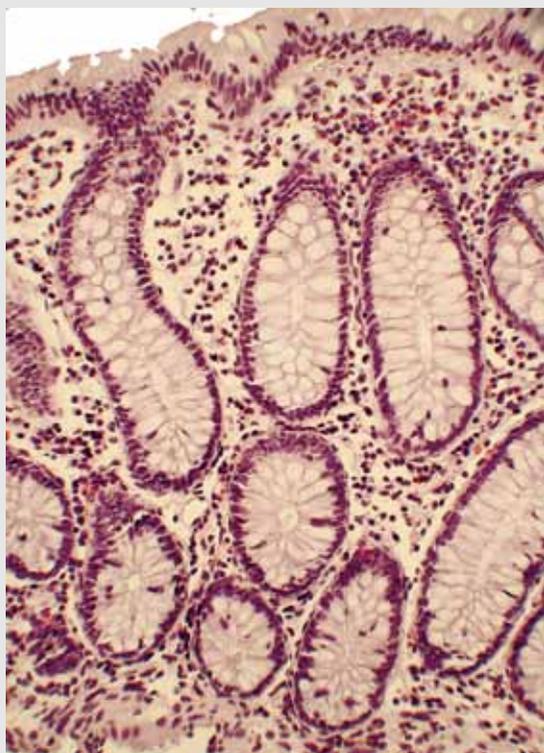


Рис. 2. Слизистая оболочка толстой кишки больного Л., 25 лет через 2 мес. после трансплантации ММСК. Собственная пластинка слабо инфильтрирована лимфоцитами и плазмацитами, крипты обычной глубины с гиперплазией бокаловидных клеток. Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.:  $\times 250$

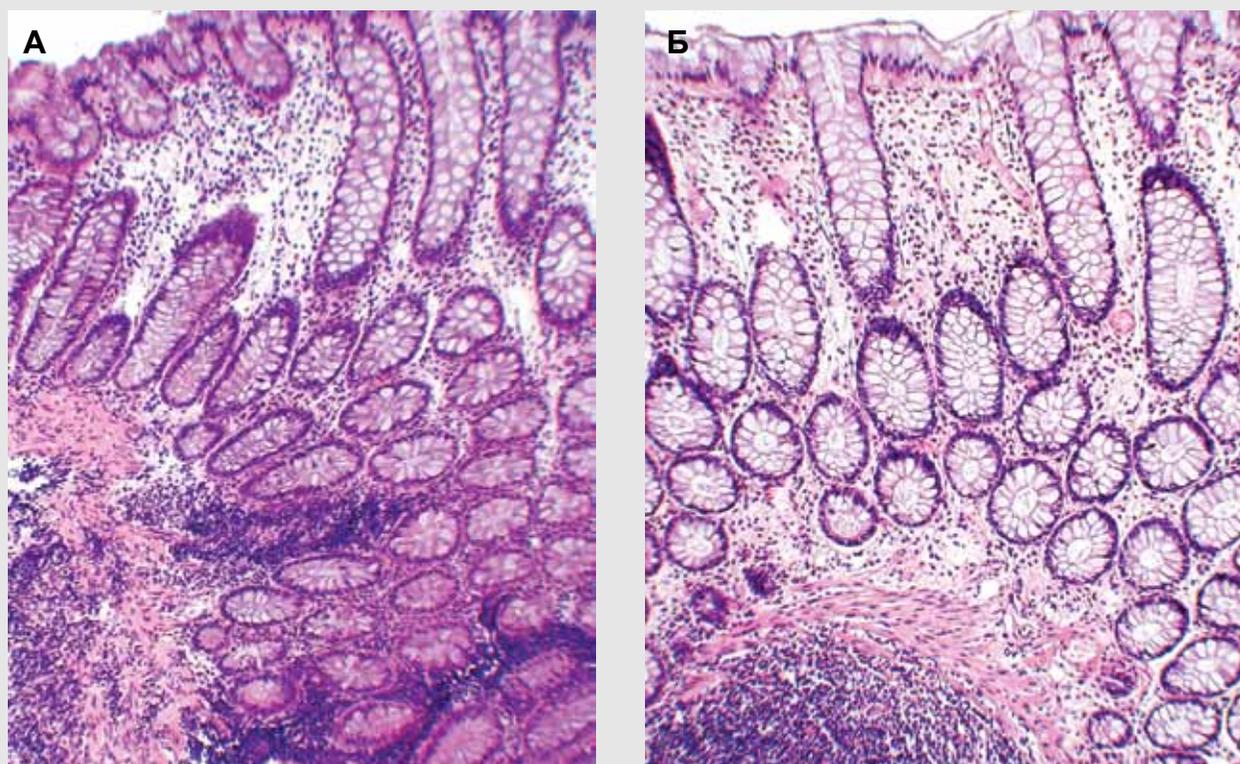


Рис. 3. Слизистая оболочка толстой кишки при БК: А – активная фаза, лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки с распространением на подслизистый слой; Б – фаза ремиссии после терапии Инфликсимабом, уменьшение воспалительной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки. Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.:  $\times 250$

Для оценки стабильности ремиссии у больных БК, которые получали ММСК и терапию ИНФ, использовали процедуру Каплана – Мейера, сравнивающую методы лечения. При сравнении двух кривых выживаемости (стабильность ремиссии) в течение первого года у больных БК, которые получали комплексную терапию с введением ММСК и у пациентов, которым проведена терапия ИНФ, различий выявлено не было ( $p = 0,164$ ). Средняя продолжительность ремиссии в группе ММСК составила  $11,6 \pm 0,8$  мес., в группе ИНФ –  $11,8 \pm 0,6$  мес. ( $p > 0,05$ ).

При сравнении стабильности ремиссии в течение четырех лет между обеими группами различий также не было отмечено ( $p = 0,058$ ). Однако средняя продолжительность ремиссии в группах различалась и составила в первой  $30,03 \pm 3,2$  мес, во второй –  $39,0 \pm 3,4$  мес. ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, через 12 мес. полная или частичная ремиссия БК в первой группе была достигнута у 21 больного (70,0%), во второй – у 17 (85,0%) ( $p = 0,38$ ), через 2 года это соотношение составило 17 (56,6%) и 16 (75,0%) пациентов соответственно ( $p = 0,31$ ), через 3 года – 15 (50,0%) и 14 (70,0%) ( $p = 0,36$ ), через 4 года ремиссия сохранялась у 14 (46,7%) больных первой группы и 13 (65,0%) – из второй ( $p = 0,59$ ).

Выявление риска возникновения рецидивов БК и оценка эффективности проведения лечения, комплексный анализ состояния иммунной системы, диагностика и рекомендации по лечению заболеваний внутренних органов, коррекция программы терапии при необходимости – вот некоторые из наиболее важных задач в программе наблюдения за больными.

Для принятия рационального решения в плане поддерживающей терапии БК необходима правильная оценка степени риска рецидива заболевания на фоне проводимой терапии. Мы сравнили обе группы больных в зависимости от метода выбранной терапии. При проведении оценки учитывали частоту рецидивов заболевания в обеих группах больных БК за 4 года наблюдения. Были получены следующие результаты. Риск развития рецидива (ОР) БК у больных, получивших ММСК и у больных, получивших ИНФ в течение первого года наблюдения составил 2,0 (95% ДИ 0,62–6,49) ( $p = 0,38$ ), в течение двух лет – 2,17 (95% ДИ 0,82–5,7) ( $p = 0,16$ ), в течение трех лет – 1,67 (95% ДИ 0,78–3,56) ( $p = 0,27$ ). Относительный риск развития рецидива БК за весь период наблюдения (48 мес.) у пациентов первой группы в сравнении со второй составил 1,52 (95% ДИ 0,77–3,02) ( $p = 0,32$ ).

Сравнивая терапевтическую эффективность ИНФ и системной трансплантации ММСК костного мозга у больных с хронической непрерывной и рецидивирующей формами БК, выяснилось, что оба метода позволяют достичь клинической и, в некоторых случаях, эндоскопической ремиссии, сохранение клинической ремиссии достигалось в большинстве случаев без ГКС ( $p = 0,95$ ). Таким образом, оба метода биологической терапии сопоставимы по конечному результату. Однако вопрос о проведении биологической терапии должен решаться индивидуально, с учетом не только риска рецидива, но и риска, связанного с самой терапией.

С развитием клеточной терапии все более актуальными становятся ее этические и правовые аспек-

ты. Больные, длительно страдающие ВЗК, относятся к группе повышенного риска в отношении онкологических заболеваний кишечника (в 7–10 раз чаще, чем в обычной популяции людей). В этой связи, для данной категории больных, онконастороженность при выполнении клеточной терапии является особенно актуальной.

В 2012 г. были опубликованы результаты мета-анализа контролируемых исследований (до 2011 г.), в которых использовались культуры ММСК при различных заболеваниях. Оценивали побочные эффекты, которые возникали у пациентов, получивших трансплантацию ММСК. Нежелательные явления были сгруппированы в соответствии с непосредственными событиями в момент введения ММСК (острая инфузионная реакция, лихорадка), осложнениями со стороны органов и систем, инфекционными осложнениями и долгосрочными неблагоприятными событиями — новообразования, летальный исход. В общей сложности был проведен анализ 2347 публикаций и 36 клинических исследований с целью выявления нежелательных эффектов после введения ММСК. Провели оценку состояния 1012 участников клинических исследований, получивших ММСК по поводу ишемического инсульта, болезни Крона, кардиомиопатии, инфаркта миокарда, реакции «трансплантат против хозяина», а также здоровых добровольцев. По результатам проведенного мета-анализа рандомизированных контролируемых исследований не было установлено связи между введением ММСК и осложнениями со стороны органов и систем, инфекционными осложнениями, злокачественной трансформацией и смертельными случаями. Выявлена значимая связь между введением ММСК и транзитной лихорадкой. Основываясь на результатах проведенных клинических исследований, трансплантация ММСК представляется безопасным методом лечения. Однако необходимы дальнейшие контролируемые клинические исследования со строгой отчетностью побочных эффектов для дальнейшего определения профиля безопасности терапии ММСК [22].

Безопасность введения ММСК мы оценивали по состоянию слизистой оболочки кишки и уровню онкомаркеров СА 19-9, СА 242, РЭА и ТФР-1 $\beta$ . Исходный уровень онкомаркера СА 242 до трансплантации ММСК составил  $5,26 \pm 0,2$  Ед/мл, уровень СА 19-9 —  $5,03 \pm 0,18$  Ед/мл, РЭА —  $0,9 \pm 0,2$  Ед/мл (максимальный уровень до  $8,8$  Ед/мл). Через 6 мес. уровень онкомаркера СА 242 составил  $4,9 \pm 0,17$  Ед/мл, СА 19-9 —  $4,83 \pm 0,16$  Ед/мл, РЭА —  $1,6 \pm 0,4$  Ед/мл, через 12 мес. —  $4,8 \pm 0,17$  Ед/мл,  $4,96 \pm 0,16$  Ед/мл и

$1,4 \pm 0,3$  Ед/мл соответственно. Через 24 мес. уровень СА 242 достигал  $4,85 \pm 0,2$  Ед/мл, СА 19-9 —  $5,25 \pm 0,22$  Ед/мл, РЭА —  $1,0 \pm 0,3$  Ед/мл.

Уровень ТФР-1 $\beta$  перед трансплантацией М СА 19-9СК составил  $73,4 \pm 16,2$  пг/мл, повышаясь через 1 нед. после введения до  $792,5 \pm 50,5$  пг/мл, через 4 нед. с момента трансплантации ММСК уровень ТФР-1 $\beta$  находился на уровне  $448,6 \pm 76,1$  пг/мл. Данные концентрации ТФР-1 $\beta$  (менее 1500 пг/мл) являются безопасными с точки зрения онкологической настороженности.

Таким образом, за 48 мес. наблюдения за больными, которым была проведена трансплантация ММСК, ни в одном случае не было зарегистрировано летального исхода, повышения уровня онкомаркеров СА 19-9, СА 242, РЭА свыше 10 Ед/мл и уровня ТФР-1 $\beta$  свыше 1500 пг/мл, а также злокачественной трансформации БК по данным эндоскопических исследований.

### Заключение

На основании вышеизложенного трансплантация аллогенных ММСК костного мозга может рассматриваться как перспективный метод терапии рефрактерных форм БК, сопоставимый с терапией ИНФ в среднесрочном периоде наблюдения. Безусловно, изложенные результаты требуют дальнейшего накопления и изучения, но они вселяют оптимизм и поэтому исследование влияния трансплантированных ММСК костного мозга на течение БК должно быть продолжено. Вместе с тем, несмотря на большой объем тщательно выполненных наблюдений, они соответствуют «пилотному» характеру исследовательских работ, назначение которых — указать на новые перспективные направления в терапии ВЗК. Трансплантация ММСК является безопасным и эффективным методом лечения и может использоваться в комплексной терапии больных БК. Показано, что МСК улучшают клинические и микроскопические проявления колита, уменьшают системную и локальную, связанную со слизистой оболочкой кишечника, продукцию провоспалительных цитокинов. ММСК могут направленно двигаться в область воспаления и подавлять воспалительный процесс, одновременно стимулируя регенерацию ткани. Трансплантация ММСК, согласно наблюдениям, может обеспечивать восстановление чувствительности к предварительно неэффективной терапии [23]. Исследования эффективности клеточной терапии ММСК свидетельствуют о низкой токсичности и высокой эффективности трансплантации этого типа клеток.

### ЛИТЕРАТУРА:

Crohn B.B., Ginzburg L., Oppenheimer G.D. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. J. Amer. Med. Assoc. 1932; 99: 1323–9.  
 Белоусова Е.А. Реальные и потенциальные возможности лечения рефрактерных форм воспалительных заболеваний кишечника. Рус. мед. журн. 2005; 2: 88–95.  
 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 1998; 115(1): 182–205.  
 Malchow H., Eve K., Brandes J.W. et al. European co-operative Crohn's disease study (ECCDS): results of drug treatment. Gastroenterology 1984; 86: 249–66.  
 Summers R.W., Switz D.M., Sessions J.T. et al. National co-operative Crohn's disease study group: results of drug treatment. Gastroenterology 1979; 77: 847–69.  
 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; 121: 255–60.

Breedveld F.C. Therapeutic monoclonal antibodies. Lancet 2000; 355: 735–40.  
 Rutgeerts P., Feagan B.G., Lichtenstein G.R. et al. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. Gastroenterology 2004; 126: 402–13.  
 Wayne G. Overview of stem cell therapy for Crohn's disease. Expert. Opin. Biol. Ther. 2009; 9(7): 841–7.  
 Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 №2580-п «Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в РФ на период до 2025 года».  
 Chapel A., Bertho J.M., Bensedhoum M. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. J. Gene Med. 2003; 5: 1028–38.  
 Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 2003; 101: 3722–29.

Uccelli A., Pistoia V., Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007; 28: 219–26.

Abdi R., Fiorina P., Adra C.N. et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1759–67.

Meisel R., Zibert A., Laryea M. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indolamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619–21.

Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W.L. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2003; 4(3): 291–9.

Drakos P.E., Nagler A., Or R. Case of Crohn's disease in bone marrow transplantation. *Am. J. Hematol.* 1993; 43: 157–8.

Molendijk I., Duijvestein M., van der Meulen-de A.E. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease. *J. Allergy* 2012; 2012: 187408.

Best W.R., Becktel J.M., Singleton J.W. et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70(3): 439–40.

Sandborn W.J., Feagan B.G., Hanauer S.B. et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 512–30.

Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И. и др. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. *Вестник Российской Академии медицинских наук* 2004; 59(9): 71–6.

Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C. et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012; 7(10): e47559.

Oyama Y., Traynor A.E., Barr W. et al. Allogeneic stem cell transplantation for autoimmune diseases: nonmyeloablative conditioning regimens. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32 Suppl 1: S81–3.

*Поступила 26.12.2012*