

Местная терапия кишечных свищей аутогенными мезенхимальными клетками у пациентов с рефрактерной болезнью Крона

Болезнь Крона (БК) – иммунопатологическое воспаление толстого и тонкого отделов кишечника, сопровождающееся хронической болью, диареей и образованием язв. В результате хронического рецидивирующего течения заболевание осложняется появлением перфораций, кишечных свищей и стенозов. Данные осложнения лечатся только паллиативными хирургическими методами. Очень часто после иссечения свищей возникают рецидивы в связи с низкой репаративной активностью в зоне хронического воспалительного процесса.

Опираясь на факт чётко установленного аутоиммунного патогенеза БК, были начаты клинические испытания метода аутогенной трансплантации гемопоэтических клеток для лечения рефрактерных форм [1, 2]. Системное введение аутологических гемопоэтических и аллогенных клеток костного мозга на фоне иммуносупрессии продемонстрировало безопасность и эффективность таких подходов [1–4]. В настоящее время испытания продолжаются.

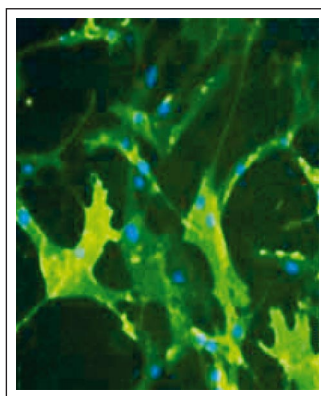
Известно, что миграция или трансплантация прогениторных клеток костного мозга стимулирует процесс репаративной регенерации поврежденных тканей [5, 6]. Гипотеза о том, что малодифференцированные клетки, изолированные из костного мозга или жировой ткани и введенные в зону хронического воспаления могут индуцировать или стимулировать репаративные процессы, была положена в основу исследований по эффективности местной клеточной терапии БК. Два года назад испанская группа Garcia-Olmo впервые сообщила об успешной трансплантации аутогенных клеток, выделенных из жировой ткани, для лечения ректовагинального свища у пациентки с БК [7]. В недавнем номере журнала Diseases of the Colon & Rectum опубликованы результаты I фазы клинических испытаний такого подхода для лечения рефрактерной БК, выполненных этой же группой исследователей.

В исследование было включено 10 пациентов, отобранных по следующим критериям: возраст старше 18 лет, наличие установленного диагноза БК более 5 лет, отсутствие лечебного эффекта на стандартную терапию, аллергические реакции на специфические препараты, индекс БК более 250, наличие кишечных свищей в качестве осложнения основного заболевания.

У пациентов забирали липоаспира́т в объеме 100 мл. Из полученного материала в культуре выделяли клетки, называемые авторами «мезенхимальными стволовыми» (МСК), экспрессирующие c-Kit (CD117), CD90 и виментин на 2–3 пассажах.

Ход свища кюретировали обычным способом или с применением эндоскопической техники, после чего клетки в количестве 3–30 млн вводили в стенку свища или в слизистую и подслизистую оболочку прямой кишки (в зависимости от локализации свища). Для дополнительной герметичности свищевой ход обрабатывали фибриновым клеем и ушивали. Пациенты выписывались под амбулаторное наблюдение на 3–и сутки. Общее время наблюдения составляло от 7 до 22 месяцев.

У 6 пациентов из 8 произошло полное закрытие свищевых ходов без рецидива в указанные сроки наблюдения.



Иммуноцитохимическое окрашивание на CD90. Культура клеток, выделенных из липоаспи́рата пациента с БК; 6-й пассаж. Из Dis. Colon Rectum 2005; 48: 1416–23

У 2-х пациентов наружное отверстие свища закрылось полностью. В отдаленном послеоперационном периоде выполняли биопсию из мест трансплантации. В результате гистологического и цитологического исследования данных, указывающих на наличие неоплазии, выявлено не было.

Основываясь на полученных данных, авторы считают метод клеточной трансплантации МСК жировой ткани для лечения кишечных свищей у пациентов с БК безопасным и эффективным. Не было получено никаких неблагоприятных реакций на введение трансплантационного материала. Также не было выявлено зависимости эффекта от количества введенных клеток. Группа приступает ко II фазе клинических испытаний.

В этом исследовании была оценена лишь безопасность метода. Говорить о клинической эффективности можно будет только при рандомизации и сравнении с контрольной группой. В работе также не приводятся данные по динамике индекса активности БК после трансплантации. Данные, указывающие на безопасность местной трансплантации МСК, полученные авторами, очень важны, поскольку в эксперименте было показано, что клетки костного мозга, мигрирующие в очаг хронического воспаления желудочно-кишечного тракта, могут стать причиной возникновения аденокарциномы [8]. Катамнестические данные и морфологические исследования биоптатов отрицают образования опухолей у пациентов через год после проведения процедуры.

Остаётся неясным механизм действия пересаженных клеток. Авторы опирались на исследования, демонстрирующие эффективность трансплантации мышечной ткани в закрытии свищей, вызванных БК [9] и возможность дифференцировки МСК подкожного жира в миоциты [10]. Однако, чтобы показать дифференцировку пересаженных клеток, нужно их маркировать *in vitro* и выполнить ряд иммуногистохимических исследований биопсийного материала. В дискуссии статьи авторы указывают, что морфологически биоптаты (n=2) представляли собой рубцовую ткань. Поэтому, скорее всего, введенные клетки стали источником фибробластов и сформировали рубец. Однако, МСК могли индуцировать и



резидентные клетки (слизистой и подслизистой основы) к ускоренной репарации и формированию рубца.

На многие вопросы может ответить более тщательно подготовленная II фаза испытаний метода. Однако уже сейчас

можно говорить о перспективности этого простого метода, который может стать альтернативой прочим методам лечения осложнений рефрактерной болезни Крона и значительно улучшить качество жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Burt R.K., Traynor A., Oyama Y., Craig R. High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003; 101; 5: 2064–6.
2. Oyama., Craig R.M., Traynor A.E. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterol.* 2005; 128: 552–63.
3. Lopez-Cubero S.O., Sullivan K.M., McDonald G.B. Course of Crohn's disease after allogeneic marrow transplantation. *Gastroenterol.* 1998; 114: 433–O.
4. Kreisel W., Potthoff K., Bertz H. et al. Complete remission of Crohn's disease after high-dose cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32; 3: 337–40.
5. Hess D., Li L., Martin M. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21; 7: 763–70.

6. Yannaki E., Athanasiou E., Xagorari A. et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp. Hematol.* 2005; 33: 108–19.

7. Garcia-Olmo D., Garcia-Arzan M., Garcia L.G. et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int. J. Colorectal Dis.* 2003; 18: 451–4.

8. Houghton J.-M., Stoicov C., Sachiyo Nomura, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306: 1568–71.

9. Rius, J., Nessim A., Noguera J.J., Wexner S.D. Gracilis transposition in complicated perianal fistula and unhealed perineal wounds in Crohn's disease. *Eur. J. Surg.* 2000; 166: 218–22.

10. Mizuno H., Zuk P.A., Zhu M. et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002; 109: 199–O9.

Подготовил А.В. Волков;

по материалам *Dis. Colon Rectum* 2005; 48: 1416–23.

Изучение миграции и хоуминга клеток костного мозга в миокард после инфаркта в клинике

После завершения I–II фаз клинических испытаний метода клеточной кардиомиопластики с целью регенерации миокарда после инфаркта в нескольких центрах разных стран мира, механизм действия введенных клеток остаётся неясным. Ряд исследователей считает, что применение нефракционированных клеток костного мозга для этой цели не имеет под собой никакого научного смысла. Однако, клиническая эффективность такого подхода была показана в ряде клинических испытаний [1].

Критичным моментом при внутривенном или интракоронарном введении клеток является их хоуминг и энграфтинг в постинфарктный миокард. Скорее всего, эти события будут играть значительную роль и в реализации терапевтического эффекта, если даже механизм введенных клеток – паракринный, а их трансдифференцировка невозможна [2]. Хоуминг эндотелиальных прогениторных и CD34+ гемопоэтических клеток костного мозга человека, меченных разными флуоресцентными и радиоактивными метками, ранее был изучен в экспериментальных моделях [3–5].

Два года назад в исследовании BOOST группы Wollert K.C., опубликованном в *Lancet*, была показана клиническая эффективность интракоронарной инфузии взвеси аутологичных нефракционированных мононуклеарных клеток костного мозга пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда и подвергшихся баллонной ангиопластике инфаркт-связанной артерии [1]. В настоящем исследовании этой же группы, опубликованном в журнале *Circulation*, авторы изучали миграцию и хоуминг клеток костного мозга пациентов, подвергшихся точно такому же воздействию, как и в протоколе BOOST.

Клетки вводили 9-ти пациентам, отобранным по протоколу BOOST [1], через 10 дней после стентирования, по трём разным методикам. Первой группе пациентов (объём аспирированного костного мозга 126–145 мл.) в инфаркт-связанную артерию вводили нефракционированные клетки, меченные радиоактивным изотопом ^{18}F -FDG (5% от общего количества),

а немеченные клетки (остальные 95%) – в дополнительные окклюзированные артерии. Второй группе пациентов (аналогичный объём аспирированного костного мозга) вводили половину меченных (5% от общего количества) нефракционированных клеток в периферическую вену с графической детекцией изотопа через час, после чего все остальные клетки (вторая половина меченных и 95% немеченных) инфузировали в инфаркт-связанную артерию и детектировали через 70 минут. Третьей группе пациентов ($n=3$) с большим объёмом аспирированного костного мозга (277–336 мл) вводили меченые CD34+ клетки (12, 14,7 и 21 млн соответственно, изолированные магнитным сортированием) в инфаркт-связанную артерию и часть нефракционированных клеток (с удалёнными CD34+) – в дополнительные окклюзированные артерии.

В группе 1 через час после введения более 85% сигнала (от меченых клеток) идентифицировали в печени и селезёнке, в миокарде (только в области введения) всего – 1,3–2,6%. В группе 2 также более 84% меченых клеток (после введения в периферическую вену) идентифицировали в печени и селезёнке, сигнал в миокарде был недетектируемым; при последующем интракоронарном введении получали уровень сигнала в миокарде, схожий с группой 1 – 1,8–5,3%. В группе 3 регистрировали максимальный сигнал в миокарде (в области введения), который составлял 14, 24 и 39% соответственно, и более 55% меченых клеток – в печени и селезёнке.

Таким образом, авторами было показано, что лишь небольшой процент клеток (1–5%) нефракционированного костного мозга способен к миграции и энграфтингу в поврежденный миокард, через час после их внутрисосудистого введения. По-видимому, основную часть этой популяции составляют CD34+ клетки. Поэтому имеет смысл производить селекцию и/или культивирование клеток костного мозга перед интракоронарным или внутривенным введением, тем самым увеличивая процент (а в ряде случаев и абсолютное количество) функционально активных клеток, и, следовательно, их