

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

Мезенхимальные стромальные клетки в комплексной противовоспалительной терапии язвенного колита

Л.Б. Лазебник¹, О.В. Князев¹, А.Г. Конопляников², А.И. Парфенов¹, П.Л. Щербakov¹, В.Э. Сагынбаева¹

¹Центральный Научно-исследовательский институт гастроэнтерологии Департамента здравоохранения Москвы

²Медицинский радиологический научный центр МЗ и СР РФ, г. Обнинск

Mesenchymal stromal cells in complex anti-inflammatory therapy of ulcerative colitis

L.B. Labeznik¹, O.V. Knyazev¹, A.G. Konoplyannikov², A.I. Parfyenov¹, P.L. Scherbakov¹, V.E. Sagynbaeva¹

¹Central Research Institute of Gastroenterology of the Moscow Department of Public Health

²Medical Radiology Research Center of the RF Ministry of Public Health and Social Department, Obninsk

Прогресс в изучении патогенеза язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК) и полученные данные о иммунорегуляторных механизмах, происходящих в организме человека, открыли новые направления в терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Таким перспективным методом лечения является биологическая, в том числе клеточная терапия. Многочисленные работы показали, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) могут служить в качестве альтернативной терапии больных ВЗК, у которых терапия генно-инженерными моноклональными антителами оказалась неэффективна. Цель настоящей работы – разработка оптимальных схем введения культуры аллогенных ММСК для повышения эффективности противовоспалительной терапии ВЗК.

Больных с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением ЯК в зависимости от метода проводимой терапии распределили на 3 группы: I группа больных (n = 15), которым ММСК вводились трижды в течение месяца с интервалом 1 нед. и еще один раз через 6 мес. с момента первого введения ММСК; больные II группы (n = 20) получали ММСК дважды в течение месяца с интервалом 1 нед. и еще один раз через 6 мес. с момента первого введения ММСК; больным III группы (n = 20) ММСК вводились однократно; в IV группе больных (n = 20) применялась только стандартная консервативная противовоспалительная терапия. Эффективность лечения оценивали по индексам клинической, эндоскопической патогистологической активности, продолжительности ремиссии. Результаты работы продемонстрировали, что наиболее эффективна трансплантация ММСК костного мозга с более частым введением – дважды и трижды в течение одного месяца с интервалом 7–10 дней и еще один раз через 6 мес. Это позволяет снизить риск развития рецидива и усиления патологической симптоматики у больных хроническим рецидивирующим и хроническим непрерывным течением ЯК, увеличить продолжительность ремиссии, уменьшив тем самым частоту госпитализаций и улучшив качество жизни больных ВЗК.

Ключевые слова: болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника, мезенхимальные стромальные клетки, язвенный колит.

Progress in studying the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) and the data on the immunoregulatory mechanisms that occur in the human body, have opened new avenues in the treatment of IBD. Thus a promising method of treatment is biological, including cell therapy. Numerous studies have shown that multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) can serve as an alternative therapy for patients with IBD who were not able to respond to the therapy of genetically engineered monoclonal antibodies. The aim of this work is the development of optimal schemes injection of MMSC to enhance anti-inflammatory therapy of IBD.

Patients with chronic continuous and chronic relapsing UC depending on the method of therapy were divided into 4 groups: I group of patients with ulcerative colitis (n = 15), which MMSC injected three times a month at intervals of 1 week after 6 months from the date of first introduction of MMSC, II group of patients with ulcerative colitis (n = 20) received MMSC twice a month at intervals of 1 week after 6 months from the date of first introduction of MMSC, III group of patients UC (n = 20) received a single dose MMSC, IV group patients with ulcerative colitis (n = 20) received standard anti-inflammatory therapy drugs. The effectiveness of therapy was evaluated by clinical indices, endoscopic histopathological activity, duration of remission. The results of the work demonstrated that the most effective transplantation of allogeneic MMSC in the bone with a more frequent administration – twice and three times in one month at intervals of 7–10 days in 6 months. This helps reduce the risk of recurrence in patients with chronic relapsing and chronic continuous course of UC, increase the duration of remission, thus reducing the frequency of hospital admissions and improved quality of life of IBD.

Key words: Crohn's disease, inflammatory bowel disease, mesenchymal stromal cells, ulcerative colitis.

В последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости и распространенности болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК) — двух основных форм хронических неспецифических воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). В США и странах Западной Европы отмечаются более высокие темпы роста, чем в других странах мира. Ежегодно в США регистрируется более 1 млн новых случаев ВЗК, причем 50% случаев приходится на ЯК и 50% — на БК [1, 2]. Обе формы ВЗК повышают риск развития рака толстой кишки и значительно увеличивают общую заболеваемость и смертность в мире. Дебютируя в раннем возрасте, сохраняют свою активность на протяжении длительного времени, приводят в конечном итоге к инвалидизации. Этиология ЯК и БК до сих пор остается неизвестной, а патогенез ВЗК обусловлен сложными взаимодействиями генетических, экологических, микробных и иммунных факторов. Прогресс в изучении патогенеза ВЗК и полученные данные о иммунорегуляторных механизмах, происходящих в организме человека, открыли новые направления в терапии ЯК и БК. Так, перспективным терапевтическим подходом является биологический, включающий методы клеточной терапии [3, 4].

Разработанные генно-инженерные биологические препараты осуществили значительный прорыв в лечении ВЗК. Применение адалимумаба, инфликсимаба, цертолизумаба пегола (антагонистов фактора некроза опухолей- α , ФНО- α) продемонстрировало уменьшение продолжительности рецидива заболевания, активности и тяжести течения, доказало эффективность в поддержании клинико-эндоскопической ремиссии заболевания в течение длительного времени. В настоящее время существует множество генно-инженерных биологических препаратов, используемых для лечения ВЗК. Однако большинство этих иммуномодулирующих препаратов, к сожалению, являются дорогостоящими и токсичными. Около 30% больных воспалительными заболеваниями кишечника нуждаются в проведении альтернативной биологической терапии [5]. В свете этого необходим поиск новых методов для лечения ВЗК. Комплекс патологических процессов, возникающих при ВЗК, требует восстановления нарушенного дисбаланса иммунной системы, нормализацию баланса микробиоты кишечника и восстановления поврежденной слизистой оболочки кишки. Контролируемая дифференцировка соматических стволовых клеток имеет большой терапевтический потенциал для обеспечения репаративной регенерации тканей и лечения многих дегенеративных и аутоиммунных заболеваний. Достижения в изучении иммуносупрессивного и регенеративного эффекта мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) открывают возможность разработки новых препаратов, которые помогут достичь более продолжительной ремиссии ЯК и БК, а также уменьшить риск развития осложнений ВЗК.

Появившиеся в научной медицинской литературе данные и наши собственные результаты демонстрируют, что биологическая терапия хронических ВЗК имеет значительные преимущества по сравнению с существующей традиционной противовоспалительной терапией препаратами 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) и иммуносупрессорами [6, 7]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внедрение современных методов биологической

терапии ВЗК обеспечивает не только быстрое купирование атаки заболевания и увеличение продолжительности ремиссии, но также позволяет помочь преодолеть рефрактерность и зависимость к глюкокортикостероидам, тем самым повышая эффективность лечения этих заболеваний.

Материал и методы

С 2008 г. в отделе патологии кишечника ЦНИИ гастроэнтерологии впервые в нашей стране проводится системная трансплантация ММСК костного мозга больным ВЗК 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 президиумом РАМН. Ученым Советом ЦНИИ гастроэнтерологии утвержден «Протокол ограниченных клинических испытаний метода системной трансплантации аллогенных ММСК 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 больных с хроническим рецидивирующим и хроническим непрерывным течением ЯК мужского и женского пола в возрасте от 18 до 69 лет, которые имели достоверный диагноз ЯК, подтвержденный эндоскопически и гистологически. Пациентам объяснили цели исследования и возможные риски. Больных исключали из исследования, если они имели сероположительный результат при определении поверхностного антигена к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С, положительную реакцию на ВИЧ, положительную RW, наличие в анамнезе лимфопролиферативных заболеваний или злокачественных опухолей любой локализации, психиатрические нарушения, наркозависимость или любые прочие нарушения, которые негативно влияли на способность адекватно понимать и давать письменное информированное согласие на участие в настоящем исследовании.

Для реализации поставленной задачи по оптимизации клеточной терапии нами были сформированы четыре группы больных ЯК с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением в зависимости от метода проводимой терапии: I группа больных ЯК ($n = 15$), которым ММСК вводились трижды в течение месяца с интервалом 1 нед. и еще один раз через 6 мес. с момента первого введения клеток; больные II группы ($n = 20$) получали ММСК дважды в течение месяца с интервалом 1 нед. и еще один раз через 6 мес., больным III группы ($n = 20$) ММСК вводили однократно. Больным данных трех групп за 2–3 дня до введения клеток отменяли иммуносупрессоры (азатиоприн), снижали дозу кортикостероидов до 15–20 мг/сут. с постепенной полной отменой (при отсутствии рецидива заболевания), дозу аминокислот оставляли на уровне 2,0 г/сут. В IV группе больных ($n = 20$) применялась стандартная противовоспалительная терапия препаратами 5-АСК (5-аминосалициловой кислоты) в среднесуточной дозе 3,0–4,0 г/сут., глюкокортикостероидами в дозе 0,5–0,75 мг/кг/сут. Возраст больных во всех группах

находился в пределах от 20 до 36 лет (медиана – 26 лет), большинство больных ($n = 38$ (69%)) – мужчины. Продолжительность болезни составляла от 3 до 5 лет (медиана – 2 года). Существенных различий в группах больных по демографическим показателям не было (табл. 1).

Для оценки клинической активности ЯК применялся индекс, предложенный D. Rachmilevitz (1989)

(табл. 2), учитывающий частоту дефекаций и интенсивность болевого синдрома, кровопотерю и общее самочувствие, повышение температуры, наличие и характер внекишечных проявлений, уровень гемоглобина и СОЭ [8]. Его колебания варьировали от 0 до 29 баллов. Больным проводили общеклинические и биохимические анализы крови, мочи и кала, а также исследовали онкомаркеры (СА19-9, СА 242, РЭА).

Таблица 1. Характеристика больных ЯК, вовлеченных в исследование

Показатель	I группа	II группа	III группа	IV группа
Возраст, годы	34,25±1,9	35,1±1,8	34,1±1,6	32,5±3,6
Длительность ЯК, годы	3,34±0,3	3,36±0,3	3,6±0,3	4,25±1,6
Средняя продолжительность приема азатиоприна до трансплантации МСК, мес	6,86±0,6	6,97±0,6	6,9±0,6	7,25±0,78
Индекс эндоскопической активности Мейо, баллы	8,1±0,27	8,0±0,24	8,2±0,2	8,2±0,42
Индекс клинической активности Рахмилевича, баллы	8,6±0,3	8,5±0,34	8,5±0,4	8,5±0,4
Индекс патоморфологической активности Гебса, баллы	4,2±0,16	4,1±0,27	4,1±0,2	4,2±0,1
Мужчины	11/73,3*	13/65,0*	14/70,0*	14/70,0*
Женщины	4/26,7*	7/35,0*	6/30,0*	6/30,0*

Примечание: * – в числителе – абсолютное число больных, в знаменателе – доля от общего количества пациентов в процентах.

Таблица 2. Схема расчета индекса клинической активности язвенного колита по D. Rachmilevitz (1989)

Параметр	Характеристика	Баллы
Количество дефекаций за последнюю неделю	< 18	0
	18–35	1
	36–60	2
	> 60	3
Кровопотеря за неделю	Нет: стул с кровью 0–1	0
	Немного: < 30%	2
	Много: >30%	4
Общее самочувствие за неделю	0–3 (хорошее)	0
	4–10 (удовлетворительное)	1
	11–17 (плохое)	2
	18–21 (очень плохое)	3
Боли в животе за неделю	0–3 (нет)	0
	4–10 (слабая)	1
	11–17 (умеренная)	2
	18–21 (выраженная)	3
Температура	< 38°	0
	> 38°	3
Внекишечные проявления	Нет	0
	Иридоциклит (увеит)	3
	Узловатая эритема	3
	Артриты	3
Лабораторные данные	СОЭ < 50 мм\ч и Нв > 100 г\л	0
	СОЭ > 50 мм\ч	1
	СОЭ > 100 мм\ч	2
	Нв < 100 г\л	4

Эндоскопическое исследование проводили на видеосистеме фирмы Фуджинон EVE W-88A. Эндоскопическую картину ЯК оценивали с помощью шкалы Мейо (табл. 3) [9]. При исследовании макроскопически оценивалось состояние слизистой оболочки толстой кишки.

Всем больным проводилась лестничная биопсия из измененных отделов толстой или подвздошной кишки аппаратом SIF-10L с получением 4–5 фрагментов слизистой оболочки. Морфометрическое исследование выполнялось с помощью системы автоматического анализа видеоизображений «Cito-W» (Dia-Morph). Оценку гистологических препаратов ЯК осуществляли по шкале Гебса (табл. 4) [10]. Критерием эффективности терапии у больных ЯК с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением является безрецидивное течение заболевания в течение 12 мес. [11].

Таблица 3. Схема вычисления индекса эндоскопической активности язвенного колита по шкале Мейо

Параметр	Характеристика	Баллы
Зернистость слизистой оболочки	Отсутствует	0
	Присутствует	2
Сосудистый рисунок	Четкий	0
	Смазан	1
	Отсутствует	2
Ранимость слизистой оболочки	Нет	0
	Контактная кровоточивость	2
	Спонтанная кровоточивость	4
Повреждение слизистой оболочки (слизь, фибрин, гной, эрозии, язвы)	Нет	0
	Слабое	2
	Выраженное	4

Таблица 4. Патогистологическая шкала Гебса (M±m)

Патогистологические показатели	Баллы
Структурные изменения	Степень 0
Нормальная структура	0.0
Незначительные патологические изменения	0.1
Умеренные диффузные или мультифокальные изменения	0.2
Выраженные диффузные или мультифокальные изменения	0.3
Хроническая воспалительная инфильтрация	Степень 1
Не повышена	1.0

Окончание таблицы 4

Патогистологические показатели	Баллы
Незначительная	1.1
Умеренная	1.2
Значительная	1.3
Нейтрофильная и эозинофильная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки	Степень 2
Нет	2A (эозинофилы)
Не повышена	2A.0
Незначительная	2A.1
Умеренная	2A.2
Значительная	2A.3
Нейтрофилы в собственной пластинке слизистой оболочки	2B (нейтрофилы)
Отсутствуют	2B.0
Незначительное увеличение	2B.1
Умеренное увеличение	2B.2
Значительное увеличение	2B.3
Межэпителиальные нейтрофилы	Степень 3
Отсутствуют	3.0
Вовлечено менее 5 % крипт	3.1
Вовлечено менее 50 % крипт	3.2
Вовлечено более 50 % крипт	3.3
Деструкция крипт	Степень 4
Отсутствует	4.0
Возможно локальное повышение количества нейтрофилов в части крипт	4.1
Возможны признаки истончения	4.2
Явная деструкция крипт	4.3
Эрозивное или изъязвленное, грануляции	Степень 5
Отсутствие эрозий, язв и грануляций	5.0
Пролиферация эпителия в области воспаления	5.1
Возможно эрозивное – очаговая отслойка	5.2
Явные эрозии	5.3
Язва или грануляционная ткань (псевдополипы)	5.4

Контроль динамики клинических симптомов и лабораторных показателей, включая исследование онкомаркеров (СА 19-9, СА 242, РЭА), осуществляли ежемесячно. Через каждые 2 мес. больным проводили эндоскопическое исследование с множественной биопсией патологически измененной слизистой оболочки кишечника. Для количественной оценки использовали средние величины указанных выше индексов клинической активности Рахмилевича, шкал Мейо и Гебса. Клиническое наблюдение за больными продолжалось в зависимости от даты введения ММСК в сроки от 12 до 36 мес.

Подробная методика получения и экспансии *in vitro* аллогенных ММСК до необходимого для системной трансплантации количества (130–180 млн клеток) опубликована ранее [12]. Метод разрешен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития МЗиСР РФ (лицензия ФС-2006/206). Клетки костного мозга (0,5–1 мл) получали путем пункции грудины или гребня подвздошной кости донора под местной анестезией в строго стерильных условиях, которые соблюдали в процессе всей дальнейшей работы с клетками в культуральном боксе. Метод культивирования позволял к концу 5–6-й недели добиться получения популяции ММСК донора в количестве $(1,5–2) \times 10^8$ клеток, необходимым для трансплантации. Выполняли иммунофенотипический анализ клеточных культур на предмет экспрессии SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124, характерных для клеток, относимых в настоящее время к ММСК. Перед внутривенным введением ММСК делали посев из клеточных культур для контроля возможного бактериального загрязнения.

Культуру ММСК вводили внутривенно в дозе около 3 млн на 1 кг массы тела. Для осуществления системной трансплантации 150–200 млн аллогенных ММСК выполняли суспендирование клеток в 200 мл стерильного физиологического раствора NaCl, содержащего гепарин в концентрации 50 ед/мл, и через капельницу вводились пациенту в течение 40–60 мин. Введение культуры ММСК больным являлось точкой включения в протокол исследования.

Контроль динамики клинических симптомов и лабораторных показателей осуществляли ежемесячно. Через каждые 2 мес. больным проводили эндоскопическое исследование с множественной биопсией патологически измененной слизистой оболочки кишечника. Для количественной оценки использовали средние величины указанных выше индексов клинической активности Рахмилевича, шкал эндоскопической активности Мейо и патогистологической активности Гебса. Клиническое наблюдение за больными продолжалось в зависимости от даты введения ММСК в сроки от 12 до 36 мес.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики, достоверность различий средних величин сравнимых показателей оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Для оценки продолжительности ремиссии использовался метод построения кривых выживаемости (метод Каплана и Майера) [13]. Статистический анализ относительного риска развития рецидива заболевания проводился с использованием двупольной таблицы при помощи программы Open Epi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health), версия 2.3

(2009/20/05). Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики пакета Excel Microsoft и программы Biostat, SISA и EpiMax Table Calculator. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Результаты и обсуждение

При выполнении иммунофенотипического анализа, было показано, что полученные клетки во всех исследованных случаях имели фенотип SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124, что позволяет обоснованно отнести клетки к популяции ММСК. Ни в одном случае по данным бактериологических методов исследования не была показана бактериальная контаминация клеточных культур.

У больных I группы исходный индекс клинической активности в среднем составил $8,6 \pm 0,3$ балла, у больных II группы – $8,5 \pm 0,34$ балла, у больных III группы – $8,5 \pm 0,4$ балла, у больных IV группы – $8,5 \pm 0,24$ балла ($p > 0,05$). Показатели эндоскопической активности ЯК в каждой из них находилась в пределах от 5 до 11 баллов и в среднем составляли $8,1 \pm 0,27$; $8,0 \pm 0,24$; $8,2 \pm 0,4$ и $8,2 \pm 0,42$ баллов соответственно ($p > 0,05$). Исходный индекс Гебса составил в I группе $4,2 \pm 0,16$ баллов, во II – $4,1 \pm 0,27$, в III – $4,1 \pm 0,2$, в IV – $4,2 \pm 0,1$ балла ($p > 0,05$). Таким образом, все группы были сопоставимы по основным клиническим, эндоскопическим и патогистологическим показателям (см. табл. 1).

По результатам клинических, эндоскопических и морфологических исследований слизистой оболочки толстой кишки нами был проведен сравнительный анализ эффективности различных схем терапии больных ЯК.

Динамика индекса клинической активности и индекса эндоскопической активности Мейо за 12 мес. наблюдения представлены в табл. 5 и 6. Из табл. 5 видно, что через 2 мес. индекс клинической активности достоверно ниже в IV группе больных, получавших только консервативную терапию, по сравнению с группами 1, 2 и 3, что можно объяснить более высокими дозами глюкокортикостероидов и, соответственно, более быстрым эффектом от проводимой противовоспалительной терапии. Однако через 6 мес. отмечалось достоверное повышение уровня клинической активности в III и IV группах ($p < 0,05$). Картина менялась в сторону уменьшения индекса клинической активности в I группе больных и увеличению его во III и IV группах. Увеличение обусловлено как ухудшением клинико-лабораторных показателей в данной группе без явных признаков обострения, так и наличием больных с обострением заболевания за полгода наблюдения. Стабильность индекса I и II групп сохранялась на протяжении 12 мес., в то время как тенденция к нарастанию клинической активности язвенного колита отмечается у IV группы больных, а также у больных, которым трансплантация ММСК была осуществлена однократно (III группа). Суммарный индекс клинической активности за 12 мес. наблюдения у больных I группы достоверно снизился в среднем с $8,6 \pm 0,3$ до $1,6 \pm 0,2$ баллов, у больных II группы – с $8,5 \pm 0,34$ до $2,7 \pm 0,5$ баллов, в III группе больных – с $8,5 \pm 0,4$ до $3,3 \pm 0,5$, в IV группе больных – с $8,5 \pm 0,24$ до $3,6 \pm 0,5$. Через 24 мес. индекс клинической

активности у больных I группы составлял $1,7 \pm 0,2$ баллов, у больных II группы – $2,6 \pm 0,5$ баллов, у больных III группы – $3,6 \pm 0,5$ баллов, у больных IV группы индекс повысился до $4,0 \pm 0,5$ баллов.

Аналогичная динамика наблюдается по основным показателям эндоскопической активности, что наглядно демонстрирует табл. 6. Через 1 мес. индекс достоверно, по сравнению с исходным, снизился во всех четырех группах до $1,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$), $1,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$), $1,4 \pm 0,15$ ($p < 0,05$), $1,4 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) баллов соответственно. Через 2 мес. у больных I группы достоверно снизился в среднем с $8,1 \pm 0,27$ до $0,7 \pm 0,1$ баллов, у больных II группы – с $8,0 \pm 0,24$ до $0,7 \pm 0,1$ баллов, в III группе – с $8,2 \pm 0,2$ до $1,4 \pm 0,25$, что достоверно выше, чем в I группе, в IV группе больных – с $8,2 \pm 0,42$ до $1,2 \pm 0,2$, объективно подтверждая уменьшение морфологических признаков воспаления слизистой оболочки толстой кишки. В дальнейшем индекс эндоскопической активности ЯК уже значительно отличался: у больных I группы через 6 и 12 мес. он продолжал снижаться до $0,7 \pm 0,2$, приближаясь к уровню ремиссии, через 12 мес. составил $0,68 \pm 0,1$. У больных II группы за этот же период времени индекс составил $0,8 \pm 0,1$, сохраняясь на данном уровне к 12 мес. наблюдения ($0,7 \pm 0,1$ баллов, $p > 0,05$). Динамика индекса Мейо у больных III группы характеризовалась нарастанием к 6-му мес. до $1,6 \pm 0,1$, к 12-му мес. до $1,8 \pm 0,1$. Индекс Мейо у больных IV группы нарастал к 6 месяцу до $2,6 \pm 0,4$, сохраняясь на этом же уровне к 12-му мес. ($2,5 \pm 0,3$).

Через 24 мес. индекс Мейо у больных I группы составил $0,9 \pm 0,1$ баллов, у больных II группы – $1,4 \pm 0,1$ баллов, у больных III группы – $2,6 \pm 0,2$ баллов, у больных IV группы повысился до $2,7 \pm 0,3$ баллов, что было статистически значимо выше, чем в I и II группах.

Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК костного мозга, осуществленная дважды и трижды с интервалом 7–10 дней и еще однократно через полгода, способствовала снижению индекса клинической активности воспалительного процесса при ЯК через 12 мес. (критерий эффективности) с $8,6 \pm 0,3$ до $1,6 \pm 0,2$ баллов, что статистически значимо ниже по сравнению со значениями II, III и IV групп, а также двукратный и трехкратный режим введения ММСК костного мозга (за первый месяц) способствовал достоверному снижению индекса эндоскопической активности у больных ЯК с $8,1 \pm 0,27$ до $0,68 \pm 0,1$ и с $8,0 \pm 0,24$ до $0,8 \pm 0,1$ соответственно. Однократное введение ММСК в меньшей степени уменьшает индекс Мейо (с $8,2 \pm 0,2$ до $2,0 \pm 0,15$), но в большей степени, чем традиционная противовоспалительная терапия – с $8,2 \pm 0,42$ до $2,4 \pm 0,1$ ($p < 0,05$).

Гистологические методы исследования дают наиболее объективную информацию об активности воспалительного процесса при ЯК в табл. 7 показаны результаты гистологического исследования слизистой оболочки толстой кишки у больных через 12 мес. наблюдения, распределенные в соответствии с индексом патогистологической активности ЯК (шкала Гебса).

Таблица 5. Динамика индекса клинической активности Рахмилевича (баллы)

Группы	Исходное значение	Контрольные сроки исследования, мес.				
		1	2	6	12	24
I	$8,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,26$	$1,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$
II	$8,5 \pm 0,34$	$1,5 \pm 0,22$	$1,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,5^*$	$2,6 \pm 0,5^*$
III	$8,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,16$	$1,6 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,5^{**}$	$3,3 \pm 0,5^{**}$	$3,6 \pm 0,5^{**}$
IV	$8,5 \pm 0,24$	$1,4 \pm 0,26$	$1,3 \pm 0,3^{**}$	$3,0 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5^{***}$	$4,0 \pm 0,5$

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении I и II групп; ** – $p < 0,05$ при сравнении I и III групп; *** – $p < 0,05$ при сравнении III и IV групп.

Таблица 6. Динамика индекса эндоскопической активности Мейо (баллы)

Группы	Исходное значение	Контрольные сроки исследования, мес.				
		1	2	6	12	24
I	$8,1 \pm 0,27$	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,15$	$0,7 \pm 0,2$	$0,68 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
II	$8,0 \pm 0,24$	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1^*$	$1,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1^*$
III	$8,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,15$	$1,4 \pm 0,25^{**}$	$2,6 \pm 0,4^{**}$	$2,0 \pm 0,15^{**}$	$2,6 \pm 0,2^{**}$
IV	$8,2 \pm 0,42$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1^{***}$	$2,7 \pm 0,3$

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении I и II групп; ** – $p < 0,05$ при сравнении I и III групп; *** – $p < 0,05$ при сравнении III и IV групп.

Таблица 7. Динамика индекса патоморфологической активности Гебса (баллы)

Группы	Исходное значение	Контрольные сроки исследования, мес.				
		1	2	6	12	24
I	4,2±0,16	1,2±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1
II	4,1±0,27	1,2±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1*	1,2±0,1*	1,1±0,1
III	4,1±0,2	1,4±0,2	1,2±0,1	1,4±0,2**	1,9±0,2**	2,1±0,2**
IV	4,2±0,1	1,4±0,2	1,3±0,1	1,6±0,2	2,2±0,2***	2,9±0,3***

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении I и II групп; ** – $p < 0,05$ при сравнении I и III групп; *** – $p < 0,05$ при сравнении III и IV групп.

Как уже было отмечено выше, степень патогистологической активности ЯК была практически одинакова во всех группах. Через 12 мес. в группе больных, которым проводилось введение культуры клеток с непродолжительным (дважды и трижды в месяц) интервалом индекс Гебса снизился с $4,2 \pm 0,16$ до $0,7 \pm 0,1$ и с $4,1 \pm 0,27$ до $1,2 \pm 0,1$ баллов соответственно, что достоверно ниже чем в III группе – с $4,1 \pm 0,2$ до $1,9 \pm 0,2$ баллов ($p < 0,05$) и IV группе – с $4,1 \pm 0,2$ до $2,2 \pm 0,2$ баллов. Через 24 мес. индекс Гебса у больных I и II групп снизился до $1,0 \pm 0,1$ и $1,1 \pm 0,1$ баллов соответственно, а в III и IV группах, наоборот, повысился, составив $2,1 \pm 0,2$ и $2,9 \pm 0,3$ баллов соответственно.

Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК костного мозга, осуществленная трижды и дважды в течение месяца и еще однократно через полгода, способствовала наибольшему снижению показателей индексов клинической, эндоскопической и патогистологической активности у больных ЯК через 12 мес., по сравнению с группами больных, которым трансплантация осуществлена однократно или не производилась вовсе. Через 2 года наблюдения достоверной разницы между индексами патогистологической активности в I и II группах не было.

Любая терапия должна быть направлена на улучшение прогноза течения заболевания, улучшение качества жизни больных. Это особенно важно, так как в большинстве случаев ВЗК имеет неблагоприятное течение и приводит большинство пациентов к инвалидизации. При сравнении двух кривых стабильности ремиссии ЯК у больных, которые получили культуру клеток однократно и трижды в течение одного года, статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,73$). Однако отмечалась достоверная разница между I и III группами ($p = 0,04$) и между II и III группами ($p = 0,029$).

Через два года наблюдения при сравнении двух кривых стабильности ремиссии у больных, которые получили культуру клеток однократно и трижды в течение 2 лет наблюдения, были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,043$), также отмечалась достоверная разница между I и IV группами ($p = 0,005$), в то же время различия между I и II группами (введение культуры клеток дважды и трижды) за данный период времени выявлено не было ($p = 0,348$). Через три года наблюдения продолжительность ремиссии в I группе составила $27,2 \pm 4,4$ мес., что было достоверно выше, чем в III группе – $19,2 \pm 2,4$ месяца ($p = 0,043$).

Таким образом, продолжительность ремиссии зависит от метода выбранной терапии ЯК и частоты

введения культуры клеток: более длительная ремиссия зарегистрирована у больных, которым дважды и трижды в течение месяца осуществлена системная трансплантация аллогенных ММСК, но не было достоверной разницы за два года наблюдения между группами больных с двух- и трехкратным введением клеток.

Выявление риска возникновения рецидивов ЯК и оценка эффективности проведения лечения, комплексный анализ состояния иммунной системы, диагностика и рекомендации по лечению заболеваний внутренних органов, коррекция при необходимости программы терапии – вот некоторые из наиболее важных задач в программе наблюдения за больными ВЗК. Для принятия рационального решения в плане поддерживающей терапии ЯК необходима правильная оценка степени риска рецидива заболевания на фоне проводимой терапии. В ретроспективном исследовании мы сравнили все группы больных в зависимости от метода выбранной терапии, учитывая частоту рецидивов заболевания за 1 (критерий эффективности) и 2 года наблюдения. После проведенной оценки рисков развития рецидива на основе данных исследования получены следующие результаты. Относительный риск развития рецидива ЯК за 12 мес. наблюдения у больных, получивших ММСК трижды (I группа) по сравнению с III группой составил $0,67$ (95% ДИ $0,14-3,17$) ($p = 0,68$); при сравнении больных I и II групп – $0,5$ (95% ДИ $0,5-4,94$) ($p = 1,0$); при сравнении больных III и IV групп – $0,22$ (95% ДИ $0,06-0,85$) ($p = 0,014$), в сравнении группы больных, которым осуществлена трансплантация ММСК однократно и больных IV группы, получавших только консервативную терапию, этот показатель составил $0,33$ (95% ДИ $0,13-0,86$) ($p = 0,02$). Таким образом, относительный риск развития рецидива ЯК не зависел от частоты введения ММСК в течение 1 года наблюдения (табл. 8).

За 24 мес. наблюдения относительный риск развития рецидива ЯК у больных, получивших ММСК трижды (I группа) по сравнению со III группой составил $0,24$ (95% ДИ $0,06-0,93$) ($p = 0,03$); при сравнении больных I и II групп соотношение составило $0,75$ (95% ДИ $0,2-2,79$) ($p = 1,0$), при сравнении больных I и IV групп соотношение составило $0,17$ (95% ДИ $0,05-0,62$) ($p = 0,0004$); в сравнении группы больных III и IV групп этот показатель составил $0,69$ (95% ДИ $0,44-1,8$) ($p = 0,17$). Следовательно, риск развития рецидива ЯК выше в группе больных с однократным введением ММСК по сравнению с группой больных, получивших ММСК трижды в течение первого месяца (2 года наблю-

дения) и сопоставим с относительным риском развития рецидива ЯК в группе больных, получавших только препараты 5-АСК, глюкокортикостероиды и (или) иммуносупрессоры. Риск развития рецидива ЯК одинаковый в группах больных с двукратным и трехкратным введением ММСК (табл. 9).

Таблица 8. Риски развития рецидива у больных ЯК в зависимости от кратности введения культуры клеток (1 год наблюдения)

Сравниваемые группы больных	ОР	95% ДИ	р
1 группа/3 группа	0,67	0,14–3,17	0,68
1 группа/2 группа	0,5	0,5–4,94	1,0
3 группа/4 группа	0,22	0,06–0,85	0,014
2 группа/4 группа	0,33	0,13–0,86	0,023

Примечание: ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал, р – вероятность.

Таблица 9. Риски развития рецидива у больных ЯК в зависимости от кратности введения культуры клеток (2 года наблюдения)

Сравниваемые группы больных	ОР	95% ДИ	р
1 группа/3 группа	0,24	0,06–0,93	0,03
1 группа/2 группа	0,75	0,2–2,79	1,0
1 группа/4 группа	0,17	0,05–0,62	0,0004
3 группа/4 группа	0,69	0,44–1,08	0,17

Примечание: ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал, р – вероятность.

Наибольшая эффективность клеточной терапии продемонстрирована у больных ЯК, которым трансплантация ММСК проводилась дважды и трижды в течение одного месяца с последующим введением культуры клеток через полгода, нежели у больных с однократным введением ММСК. Данное обстоятельство можно объяснить с нескольких позиций. Во-первых, необходимо учитывать «фармакокинетику» ММСК. Исследования показали, что наибольшее накопление ММСК происходит в ткани легких (> 80%), с периодом полувыведения около 24 ч [14–16], однако накопление происходит и в поврежденных органах и тканях [17]. Иммуногистохимические исследования также показали, что ММСК способны дифференцироваться в поврежденном миокарде в кардиомиоцитоподобные клетки, несущие типичные маркеры кардиомиоцитов [18], в клетки почечного эпителия проксимальных канальцев [19]. Тем не менее, большинство исследований демонстрируют низкую степень «приживляемости» ММСК, что требует иногда многократного введения культуры клеток для достижения максимальной эффективности от проводимой терапии.

С целью оценки максимальной терапевтической эффективности ММСК, а также минимизации по-

бочных эффектов, таких как опухолевый рост и недостаточная дифференцировка клеток, была создана математическая модель. За основу были взяты данные исследований, связанные с определенным режимом дозирования, частоты, кратности и количества вводимых клеток [20, 21] и представлены графически. Используя фармакокинетическую модель, а также результаты многочисленных экспериментов было сформулировано понятие «терапевтического окна», которое учитывает жизнеспособность клеток и время достижения максимальной концентрации биологически активных веществ (БАВ). Данный интервал времени находится в пределах 1–120 ч. Это время точно соответствует измеренным уровням цитокинов, которые непосредственно связаны с терапией ММСК и потенциально могут быть рассмотрены в качестве биомаркеров эффективной терапии и обеспечить долгосрочный биоответ. Следовательно, для достижения эффективной терапевтической концентрации продуктов ММСК однократного введения недостаточно.

Во-вторых, более высокая эффективность трехкратного введения ММСК может быть связана с восстановлением биорегуляторной и функциональной активности иммунного статуса больных ВЗК, особенно с длительным анамнезом и частыми курсами приема системных иммуносупрессоров. Данное положение находит своё подтверждение в экспериментах на животных. На модели сахарного диабета I типа было показано, что более существенное и длительное снижение уровня глюкозы наблюдается у животных с многократным введением ММСК по сравнению с животными, которым трансплантация производилась однократно [22].

Введенные ММСК, по-видимому, в зависимости от периода введения по-разному влияют на фазу регенерации. Описаны две фазы процесса регенерации: первая – деструктивно-реактивная, характеризующаяся накоплением в очаге повреждения специфических БАВ и формированием острофазного ответа на повреждение (стадия адаптации); вторая – пролиферативная, или стадия компенсации. Утрата тканями способности к восстановительному росту (при хроническом воспалительном процессе) обусловлена редукцией в них первой физиологической фазы – фазы острого разрушения, накопления БАВ и недифференцированных клеток. Восстановление пролиферативной активности клеток в тканях наступает лишь после резкого усиления острофазного ответа, присущих первой физиологической фазе регенерации [23, 24]. Хорошо известно, что большинство методов лечения недостаточности функции и (или) восстановления структуры органов при хроническом патологическом процессе, направлены на активацию репаративной регенерации в них через стимуляцию первой реактивно-деструктивной фазы. Также важным является то, что повторная трансплантация ММСК обеспечивает восстановление чувствительности к предварительно неэффективной терапии [25].

Заключение

Таким образом, результат нашей работы продемонстрировал, что наиболее эффективна трансплантация аллогенных ММСК костного мозга с более частым введением – дважды и трижды в течение одного месяца с интервалом 7–10 дней с

последующим однократным введением через полгода. Это позволяет снизить риск развития рецидива у больных хроническим рецидивирующим и хроническим непрерывным течением ЯК, увеличить продолжительность ремиссии, уменьшив тем самым частоту госпитализаций и улучшив качество жизни больных ВЗК. Учитывая сопоставимый результат от двух- и трехкратного введения ММСК больным ВЗК, достаточно двухкратного введения культур клеток с интервалом в одну неделю в течение первого месяца терапии. Возможно, что с целью восстановления биорегуляторной и функциональной активности иммунного статуса организма больных и усиления

регенеративных процессов необходима повторная трансплантация ММСК через 6 мес. с момента первого введения культуры клеток. Работы в данном направлении продолжаются. Проводимые многочисленные исследования позволяют понять глубинные механизмы патогенеза ВЗК и привести к разработке новых методов лечения этих заболеваний. Вместе с тем, клеточная терапия совершила революцию в лечении многих серьезных заболеваний (главным образом, онкогематологических), и мы надеемся, что комплексная противовоспалительная терапия с использованием культуры ММСК позволит добиться значительного прогресса в лечении ВЗК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kappelman M.D., Rifas-Shiman S.L., Kleinman K. et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 5: 1424–9.
2. Loftus E.V. The burden of inflammatory bowel disease in the United States: a moving target? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 5: 1383–4.
3. Arthur A., Zannettino A., Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J. Cell Physiol.* 2009; 218: 237–45.
4. Mishra P.K., Singh S.R., Joshua I.G. et al. Stem cells as a therapeutic target for diabetes. *Front Biosci.* 2010; 15: 461–77.
5. Wayne G. Overview of stem cell therapy for Crohn's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2009; 9(7): 841–7.
6. Brittan M., Alison M.R., Schier S. et al. Bone marrow stem cell-mediated regeneration in IBD: where do we go from here? *Gastroenterology* 2007; 132:1171–3.
7. Лазебник Л.Б., Конопляников А.Г., Князев О.В. и др. Использование аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения в лечении воспалительных заболеваний кишечника. *Терапевтический архив* 2010; 2(82): 38–43.
8. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial. *Br. Med.* 1989; 298: 82–6.
9. Schroeder K.W., Tremaine W.J., Ilstrup D.M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. *N. Eng. J. Med.* 1987; 317(26): 1625–9.
10. Geboes K., Riddel R., Jensfelt B. et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 404–9.
11. 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.
12. 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 РАМН* 2004; 59(9): 71–6.
13. Петри А., Сэбин К. Наглядная статистика в медицине. *Гэотар-Мед*; 2003.
14. Sjöholm I., Edman P. Acrylic microspheres in vivo. I. Distribution and elimination of polyacrylamidemicroparticles after intravenous and intraperitoneal injection in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979; 211:656–62.
15. Gao J., Dennis J., Muzic R. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001; 169: 12–20.
16. Schrepfer S., Deuse T., Reichenspurner H. et al. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant. Proc.* 2007; 39:573–6.
17. Francois S., Bensidhoum M., Mouiseddine M. et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24:1020–9.
18. Toma C., Pittenger M., Cahill K. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circ. Res.* 2002; 105: 93–8.
19. Morigi M., Imberti B., Zoja C. et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15: 1794–804.
20. Lee R., Pulin A., Seo M. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 54–63.
21. Zangi L., Margalit R., Reich-Zeliger S. et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2009; 27(11): 2865–74.
22. Banerjee M., Kumar A., Bhonde R.R. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328(1): 318–25.
23. Полежаев Л. В. Регенерация. М.; 1977.
24. Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука; 1982.
25. 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 12.07.2011