

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Лазебник Л. Б.¹, Коноплянников А. Г.², Князев О. В.¹, Парфенов А. И.¹, Ручкина И. Н.¹, Хомерики С. Г.¹,
 Рогозина В. А.¹, Коноплянникова О. А.², Царегородцева Т. М.¹

¹ ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москва

² Медицинский радиологический научный центр РАМН, г. Обнинск

Князев Олег Владимирович
 111123 г. Москва, ш. Энтузиастов, д.86
 Тел.: 8 (495) 3043078
 E-mail: oleg7@bk.ru

РЕЗЮМЕ

Системная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) усиливает репаративные процессы в поврежденных тканях, в том числе в слизистой кишечника. Представлены данные об эффективности системной трансплантации МСК в комплексной терапии для заживления слизистой кишки у больных с язвенным колитом. После трансплантации МСК у больных отмечается положительная динамика клинических проявлений заболевания и улучшение эндоскопической картины на фоне снижении дозы, а иногда при полной отмене противовоспалительных препаратов.

Ключевые слова: язвенный колит; гормонозависимость; гормонорезистентность; рефрактерность к цитостатикам; аллогенные мезенхимальные стволовые клетки.

SUMMARY

Systemic transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) is known to promote reparative process in a number of tissue damage as well as mucous healing one. It provided the basis for our study which was aimed to the effect of systemic transplantation of allogenic MSC (intravenous transfusion) in complex therapy of patients with Ulcerative Colitis.

Keywords: Ulcerative Colitis; hormonedependence; hormoneresistance; stability to cytostatics; allogenic mesenchymal stem cells.

Изучение соматических стволовых клеток привело к возникновению нового направления в медицине, получившего название «регенеративная медицина». В ее основе лежит трансплантация стволовых клеток с целью замещения поврежденных клеток в органах и тканях. Среди стволовых клеток взрослого организма особое место занимают мезенхимальные стволовые клетки (МСК), открытые в 60-е годы XX века И. Чертковым и А. Фриденштейном [16]. МСК относятся к категории прогенераторных клеток, способных к пролиферации и дифференцировке в направлении ангиогенеза, фиброгенеза и других линий тканей, принимающих участие в адаптации и восстановлении поврежденных структур организма [15; 25].

МСК костного мозга человека являются гипоиммуногенными, не подвергаются аллогенному отторжению, что обусловлено отсутствием антигена

гистосовместимости 2-го класса и низким уровнем экспрессии антигена гистосовместимости 1-го класса. Эти клетки предотвращают Т-клеточный ответ непрямым путем через модуляцию дендритных клеток и непосредственно, путем нарушения функции NK-клеток, CD8+ и CD4+ Т-клеток [8; 11; 22; 23]. МСК также обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным эффектом, мигрируя в область воспаления по хемотаксическому градиенту, выделяют вещества, ингибирующие продукцию провоспалительных цитокинов, подавляют пролиферацию Т-клеток. Кроме того, они индуцируют супрессивное местное микроокружение путем продукции ИЛ-6, — 7, — 8, — 11, — 12, — 14, — 15, — 27, лейкоз-ингибирующего фактора (ЛИФ), колони-estimulating фактора макрофагов (КСФ-М) и фактора стволовых клеток (ФСК). МСК способны

дифференцироваться в клетки костной хрящевой, жировой и нервной тканей, мышц (включая кардиомиоциты), сосудистого эндотелия, печени и т.д. [6], синтезировать цитокины и молекулы адгезии, фактор роста для эндотелия сосудов, стимулирующий ангиогенез. Таким образом, МСК являются наиболее характерными представителями стволовых клеток с высокой степенью пластичности. Эти особенности обеспечивают перспективность их успешного клинического использования с целью усиления репаративных процессов. Следует подчеркнуть, что миграция МСК из костного мозга в органы в большинстве случаев происходит после опустошения (истощения) в периферической системе МСК или при повреждении ткани. Такой процесс наблюдается, например, при переломах костей и повреждении мышечной ткани [5].

Трансплантация стволовых клеток уже прочно вошла в практику онкологии, гематологии, травматологии, все шире становится их клиническое применение в кардиологии [7], артрологии [12], иммунологии [26], неврологии, ревматологии [20], эндокринологии [13; 27], фтизиопульмонологии [1] и гепатологии [2; 4]. Появились также сообщения о применении клеточной терапии при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) [9; 19; 24]. После инфузии аллогенному реципиенту МСК не подвергаются реакции «трансплантат против хозяина», так как их поверхностный клеточный фенотип, как уже было отмечено выше, плохо распознается Т-клетками [15; 21]. Как было показано, введение мышам с экспериментальным колитом, вызванным декстраном сульфата натрия, мезенхимальных стволовых клеток стимулировало репарацию слизистой, снижало активность заболевания и повышало выживаемость животных. Более того, стволовые клетки обеспечивают баланс между толерантностью и реактивностью системы [10]. Получены положительные результаты, свидетельствующие об эффективной местной клеточной терапии болезни Крона, изучаются пути введения МСК через брыжеечную артерию при этом заболевании. Таким образом, трансплантация МСК рассматривается как потенциально новое стратегическое направление терапии ВЗК [18; 19].

Настоящее исследование проводится в рамках отраслевой программы «Новые клеточные технологии — медицине», утвержденной президиумом РАМН 29 мая 2002 г., и в соответствии с приказом МЗиСР РФ № 488 от 20 июля 2007 г., регулирующим внедрение новых медицинских технологий. Приказ устанавливает лицензирование методики получения стволовых клеток; проведение экспериментов на модели заболевания; проведение первой фазы клинических испытаний по протоколу, утвержденному Ученым советом НИИ, согласованным с локальным Этическим комитетом, и подготовку отчета для Федерального агентства по надзору

в области здравоохранения для решения вопроса о лицензировании новой технологии или продолжении работы.

Системную трансплантацию аллогенных МСК проводили в рамках клинического протокола, утвержденного Учеными советами ЦНИИГ Департамента здравоохранения Москвы и Медицинского радиологического научного центра РАМН (г. Обнинск), одобренного Этическими комитетами этих учреждений. Введение МСК проводили, заручившись информированным согласием каждого из больных.

Цель работы: определить возможности лечения больных язвенным колитом (ЯК) мезенхимальными стволовыми клетками (МСК).

Задачи работы:

1. Выявить клинические критерии влияния МСК на течение язвенного колита.
2. Определить критерии местного и системного противовоспалительного действия МСК при язвенном колите.
3. Выявить характер иммунного ответа на введение МСК при язвенном колите.
4. Оценить безопасность системной трансплантации МСК в терапии ВЗК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2008 г. в отделении патологии кишечника Центрального научно-исследовательского института гастроэнтерологии впервые в нашей стране проводится системная трансплантация МСК больным с ВЗК. С февраля 2008 г. по март 2009 г. это лечение получили 50 больных, из них 39 страдали язвенным колитом, 11 — болезнью Крона толстой (7) или терминального отдела тонкой (4) кишки. Возраст больных находился в пределах 19–60 лет, большинство (27) составляли мужчины. Продолжительность болезни составляла от 6 месяцев до 10 лет, у трех больных диагноз язвенного колита установлен впервые.

В настоящей работе приведены результаты лечения 36 больных язвенным колитом, которым трансплантация МСК проведена 2, 4 и 8 месяцев тому назад. Они составили первую (основную) группу. Показанием к трансплантации МСК являлись отсутствие эффекта от препаратов 5-АСК, гормонозависимость, гормонорезистентность и рефрактерность к цитостатикам. У 9 больных ЯК характеризовался непрерывно рецидивирующим течением и у 24 — хроническим рецидивирующим течением. У трех больных ЯК выявлен впервые.

Во вторую группу (группа сравнения) были включены 30 больных ЯК, получавших стандартную противовоспалительную терапию (5-АСК 3–4 г/сут, преднизолон 40–60 мг/сут, азатиоприн 2 мг/кг м. т.). Из них у 19 (64%) наблюдалось хроническое





Таблица 1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БОЛЬНЫХ ПО ПОЛУ, ВОЗРАСТУ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВЗК В ПЕРВОЙ (ОСНОВНОЙ) И ВТОРОЙ ГРУППЕ (ГРУППА СРАВНЕНИЯ)										
Группы	Пол		Возраст (лет)				Длительность болезни			
	м.	ж.	18–29	30–39	40–49	50–60	< 1 года	1–2 года	2–3 года	> 3 лет
Первая (основная) (n = 36)	20	16	19	10	6	1	4	9	20	3
Вторая (группа сравнения) (n = 30)	16	14	18	7	5	--	3	7	18	2

рецидивирующее течение, у 8 (26%) — непрерывно рецидивирующее течение и у 3 (10%) язвенный колит был установлен впервые (табл. 1).

Клиническую активность язвенного колита оценивали с помощью индекса Rachmilevitz (1989). Учитывали частоту дефекаций, интенсивность болевого синдрома в течение предшествующей недели, величину ежедневной кровопотери, общее самочувствие, температуру тела, внекишечные симптомы, уровень гемоглобина и СОЭ. Эндоскопическое исследование проводили на видеосистеме фирмы «Фуджинон EVE W-88А». Эндоскопическую картину оценивали с помощью шкалы Мейо. Оценивали состояние сосудистого рисунка, зернистость рельефа, степень ранимости и повреждения слизистой оболочки. Оценку гистологических препаратов осуществляли согласно шкале Гебса [17].

В табл. 2 показана клиническая характеристика больных первой и второй групп. Дистальный колит (проктосигмоидит) установлен у трех и двух больных, левосторонний (поражение до селезеночного изгиба) — у пяти и семи, субтотальный и тотальный колит — у двадцати восьми и двадцати одного больного соответственно.

У больных первой группы, получавших стандартную терапию + МСК, исходный индекс клинической активности составил $7,58 \pm 0,3$, у больных второй группы — $7,65 \pm 0,4$ ($p > 0,05$). Таким образом, обе группы были сопоставимы по основным клиническим показателям. Показатели эндоскопической активности ЯК в каждой из них находилась в пределах от 5 до 11 баллов и в среднем составляли $8,36 \pm 0,17$ и $5,96 \pm 0,03$ балла соответственно.

Перед трансплантацией МСК и спустя 2 месяца определяли в сыворотке крови показатели гуморального иммунного статуса. Использовали иммуноферментный метод и тест-системы «Протеиновый контур» (С-Петербург), Orgentec (Германия), «Ведалаб» (Франция) и др.

Метод получения и размножения аутогенных МСК в необходимом для системной трансплантации количестве (150–200 млн клеток) опубликован [3] и 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 стериль-

Таблица 2

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОТЯЖЕННОСТИ ПОРАЖЕНИЯ КИШЕЧНИКА И ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ		
Характеристика больных	Число больных	
	1-я группа (n = 36)	2-я группа (n = 30)
Протяженность поражения кишечника:		
до нисходящей кишки (проктосигмоидит)	3	2
до селезеночного изгиба	5	7
до печеночного изгиба	2	1
тотальное поражение толстой кишки	26	20
Течение заболевания:		
впервые выявленное	3	3
хроническое рецидивирующее	24	19
хроническое непрерывное	9	8

ных условиях, которые соблюдали в процессе всей дальнейшей работы с клетками в культуральном боксе. После отстаивания эритроцитов в течение 1–2 часов при комнатной температуре супернатант из суспензии костномозговых клеток отсасывали пастеровской пипеткой, выделенные клетки переносили в среду 199 (здесь и далее указанные среды и посуда закупались в фирмах, уполномоченных на поставку МЗиСР РФ). Полученную суспензию клеток центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин для получения осадка, который ресуспендировали в ростовой среде. Использовали ростовую среду RPMI-1640, содержащую пенициллин (100 ЕД/мл), амфотерицин (100 нг/мл), L-глутамин (2 мМ) и 20% эмбриональной бычьей сыворотки. Культивирование проводили в пластиковых флаконах Карреля с площадью дна 25 см², в которые вносили 5×10^6 – 10^7 клеток костного мозга в 8 мл ростовой среды. Флаконы продували газовой смесью, содержащей 5% углекислого газа и 95% воздуха, и помещали в термостат на 37 °С. Продувание флаконов такой газовой смесью проводили каждый раз, когда меняли среду или пересеивали клетки в новые культуральные флаконы. При достижении сливного (конфлюэнтного) монослоя клетки пересеивали с использованием 0,25%-ного раствора трипсина в новые флаконы, вначале с той же площадью дна (25 см²), а впоследствии — при нарастании клеточной массы — с площадью дна 175 см². Такой метод культивирования позволял к концу 5–6-й недели добиться получения популяции аутогенных МСК пациента в количестве $(1,5\text{--}2) \times 10^8$ клеток, необходимом для трансплантации в организм донора исходного костного мозга. Дополнительно проведенными исследованиями было показано, что полученные в условиях примененного в нашей работе способа культивирования клетки человека во всех исследованных случаях имели фенотип CD10^{lo}W/CD34/CD45⁺CD105⁺/c-kit-, что характерно для клеток, относимых в настоящее время к МСК. Как уже сообщалось ранее, в выполненных на лабораторных животных опытах была показана безопасность применения полученных таким способом культур МСК в отношении мутагенного, тератогенного и канцерогенного эффектов. Перед внутривенным введением больным клеток из полученных выращиванием в культуре популяций делался посев для контроля возможного бактериального загрязнения (его не было выявлено ни в одном случае).

МЕТОДИКА ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Культуру МСК вводили капель в/в однократно. Для осуществления системной трансплантации 150–200 млн аллогенных МСК, размноженных в культуре, клетки взвешивались в 200 мл стерильного физиологического раствора, содержащего гепарин в концентрации 50 ед/мл, и путем

постановки капельницы вводились пациенту в течение 40–60 минут. До введения МСК дозу ранее назначенных аminosалицилатов оставляли на уровне 2,0 г/сут, дозу глюкокортикостероидов уменьшали в два раза (не более 20 мг/сут), а цитостатики отменяли. Контроль за результатами лечения вели по динамике клинических проявлений заболевания, основываясь на индексах клинической активности язвенного колита (табл. 3), эндоскопической и гистологической картине состояния слизистой оболочки толстой кишки. Наблюдение продолжалось в течение 8 месяцев. Ежемесячно проводилась оценка безопасности и эффективности трансплантации МСК у больных с ВЗК: оценка клинического состояния больных, контроль биохимического и общеклинического анализа крови; через каждые 2 месяца проводится контрольная колоноскопия или ректоскопия с множественной биопсией и определение онкомаркеров.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики, достоверность различий средних величин сравниваемых показателей оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа для множественных сравнений, критерий Стьюдента для сравнения двух величин. Использовали пакет прикладных программ Microsoft® Office Excel 2003; Statistica v. 6.0; Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты лечения представлены в табл. 3. Через 2 месяца у большинства больных в обеих группах наблюдался положительный клинический эффект. Улучшилось общее состояние, исчезли слабость, недомогание и лихорадка, снизились частота и объем стула, значительно уменьшился или исчез болевой синдром, увеличилась масса тела. Индекс клинической активности язвенного колита в первой группе больных снизился до $1,55 \pm 0,3$ ($p < 0,05$), во второй группе — до $1,3 \pm 0,18$ ($p < 0,05$). Достоверной разницы индекса клинической активности в обеих группах через 2 месяца после проведенной терапии не отмечалось. У 6 больных первой группы положительного эффекта после трансплантации МСК не наступило: сохранялся частый жидкий стул с примесью крови, лихорадка. Одна из больных была переведена на антицитокиновую терапию инфликсимабом, а остальным назначены глюкокортикостероиды.

Через 4 месяца с начала наблюдения у 2 больных первой группы развился рецидив заболевания. Во второй группе за этот же период наблюдения



Таблица 3

ИЗМЕНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА ПО RACHMILEVITZ ЧЕРЕЗ 2, 4 И 8 МЕСЯЦЕВ								
Показатели	Исходные данные		Сроки наблюдения, группы больных					
	1-я	2-я	2 мес		4 мес		8 мес	
			1-я	2-я	1-я	2-я	1-я	2-я
Диарея	1,64 ± 0,1	1,63 ± 0,1	0,25* ± 0,1	0,07* ± 0,06	0,33* ± 0,11	0,46* ± 0,15	0,33* ± 0,11	0,53* ± 0,15
Кровопотеря	2,0 ± 0,02	2,0 ± 0,01	0,44* ± 0,18	0,36* ± 0,06	0,55* ± 0,18	0,6* ± 0,2	0,55* ± 0,18	0,6* ± 0,2
Самочувствие	1,03 ± 0,03	1,0 ± 0,01	0,25* ± 0,1	0,13* ± 0,09	0,3 ± 0,11	0,43 ± 0,14	0,3* ± 0,11	0,46* ± 0,14
Боли	0,75 ± 0,21	1,0 ± 0,01	0,16* ± 0,11	0,13* ± 0,06	0,16* ± 0,06	0,3* ± 0,09	0,16* ± 0,06	0,33* ± 0,09
Температура	1,22 ± 0,07	1,2 ± 0,28	0,16* ± 0,06	0,0*	0,2* ± 0,11	0,3* ± 0,16	0,19* ± 0,11	0,3* ± 0,16
Внекишечные проявления	0,5 ± 0,18	0,5 ± 0,2	0,16* ± 0,11	0,1* ± 0,04	0,16* ± 0,11	0,4* ± 0,2	0,16* ± 0,11	0,4* ± 0,18
Лабораторные данные	0,27 ± 0,11	0,26 ± 0,12	0,11* ± 0,07	0,13* ± 0,09	0,12* ± 0,07	0,2* ± 0,1	0,12* ± 0,07	0,2* ± 0,11
Итого	7,58 ± 0,3	7,65 ± 0,4	1,55* ± 0,3	1,3* ± 0,18	1,8* ± 0,3	2,7* ± 0,36	1,8* ± 0,3	2,9* ± 0,35

* — $p < 0,05$.

обострение язвенного колита наступило у восьми больных. При этом индекс клинической активности язвенного колита достоверно различался и составил в первой группе $1,8 \pm 0,3$, а во второй — $2,7 \pm 0,36$ ($p < 0,05$).

Через 8 месяцев в первой группе рецидивов заболевания отмечено не было, а во второй группе обострение ЯК наблюдалось у одного из них. Величина индекса Rachmilevitz достоверно отличалась и составляла в первой группе $1,8 \pm 0,3$, а во второй — $2,9 \pm 0,35$ ($p < 0,05$).

Наиболее полную информацию об активности, протяженности и характере заболевания дают эндоскопические и морфологические (гистологические) методы исследования. Индекс эндоскопической активности у больных язвенным колитом в первой группе составлял $8,36 \pm 0,17$, у больных второй группы, получавших стандартную терапию, — $5,96 \pm 0,03$. За период наблюдения динамика индекса эндоскопической активности менялась следующим образом. Через 2 месяца после проведенной терапии он достоверно снизился по сравнению с исходным показателем в обеих группах и составил в первой группе $1,16 \pm 0,09$ ($p < 0,05$), а во второй — $1,43 \pm 0,15$ ($p < 0,05$), но не имел существенных различий между группами. Через 4 месяца индекс эндоскопической активности уже достоверно различался и составил в первой группе больных $0,7 \pm 0,15$, а во второй группе сравнения — $2,4 \pm 0,25$ ($p < 0,05$). Через 8 месяцев этот показатель составил $0,76 \pm 0,15$ и $2,6 \pm 0,35$ ($p < 0,005$) соответственно (табл. 4).

На рис. 1 а* представлена эндоскопическая картина язвенного колита с непрерывно рецидивирующим течением у больного П., 32 лет, до трансплантации МСК. Слизистая оболочка толстой кишки на всем протяжении резко гиперемирована, отечная, сосудистый рисунок отсутствует, складки не определяются, просвет кишки умеренно сужен за счет отека, определяются множественные язвенные дефекты точечной и полигональной формы, покрытые фибрином, в просвете кровянистое и гноевидное содержимое. Отмечалась выраженная контактная кровоточивость.

На рис. 1 б* слизистая оболочка кишки того же больного через 2 месяца после трансплантации. Складки нормальной высоты. Слизистая оболочка розовая, гладкая, блестящая. Сосудистый рисунок усилен, перестроен. Контактная кровоточивость отсутствует.

У данного больного индекс повреждения слизистой оболочки кишки по шкале Гебса до трансплантации в среднем составлял 3,3 и характеризовался нарушением архитектоники слизистой оболочки. Количество бокаловидных клеток уменьшено, глубина крипт резко увеличена, в их просвете можно было видеть скопления лейкоцитов и крипт-абсцессы. Увеличивалось количество межэпителиальных лимфоцитов и лимфоплазмоцитарная инфильтрация собственной пластинки. Обращала на себя внимание выраженная дистрофия и некробиоз клеток эпителия (рис. 2 а, б*).

* на цветной вклейке в журнал.

Таблица 4

ИЗМЕНЕНИЕ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА ПО RACHMILEVITZ ЧЕРЕЗ 2, 4 И 8 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ								
Изменения слизистой оболочки	Исходные данные		Сроки наблюдения, группы больных					
	1-я	2-я	2 мес		4 мес		8 мес	
			1-я	2-я	1-я	2-я	1-я	2-я
Зернистость	0,5 ± 0,14	0,00 ± 0,0	0,22* ± 0,1	0,0*	0,2* ± 0,1	0,2* ± 0,1	0,22* ± 0,1	0,28* ± 0,1
Повреждение сосудов	1,75 ± 0,07	1,96 ± 0,03	1,05* ± 0,04	1,03* ± 0,03	0,6* ± 0,09	1,2* ± 0,07	0,6* ± 0,09	1,2* ± 0,07
Ранимость	2,11 ± 0,07	2,00 ± 0,00	0,44* ± 0,18	0,26* ± 0,12	0,44* ± 0,18	0,46* ± 0,15	0,42* ± 0,16	0,46* ± 0,16
Повреждения	4,00 ± 0,00	2,01 ± 0,00	0,55* ± 0,2	0,123* ± 0,09	0,66* ± 0,22	0,53* ± 0,16	0,6* ± 0,18	0,66* ± 0,2
Итого	8,36 ± 0,17	5,96 ± 0,03	1,16* ± 0,09	1,43* ± 0,15	0,7* ± 0,15	2,4* ± 0,25	0,76* ± 0,15	2,6* ± 0,35

* — $p < 0,05$.

После трансплантации наступала значительная активация пролиферации, что проявлялось гиперплазией эпителия, появлением мелких и крупных фолликулов в слизистой оболочке и подслизистом слое. Увеличивалось количество бокаловидных клеток в эпителии слизистой оболочки, структура кишечных крипт приближалась к нормальной (рис. 3 а*). Лишь в ее базальных отделах сохранялись небольшие фолликулоподобные скопления лимфоцитов (рис. 3 б*).

Из 36 больных, которым была осуществлена трансплантация МСК, у 18 (50,0%) через 4 месяца наблюдения удалось отменить полностью глюкокортикостероиды. У 10 больных среднесуточную дозу преднизолона удалось снизить до 5 мг/сут. Поддерживающую терапию осуществляли обычными дозами препаратов 5-АСК и пробиотиков. У больных второй группы через 8 мес наблюдения доза преднизолона составляла не менее 15 мг/сут.

У 12 больных трансплантация МСК привела к развитию слабой трансфузионной реакции (повышение в первые сутки температуры до 37,2–37,4 °С, артралгии, миалгии), которая самостоятельно исчезала через несколько часов. У двух больных развилась аллергическая реакция по типу крапивницы и отека Квинке, которая была купирована введением антигистаминных препаратов и глюкокортикостероидов.

В обычных условиях процессы физиологической регенерации в тканях, очевидно, не требуют дополнительного притока МСК из центрального органа и осуществляются за счет собственных резервов. Несколько иная ситуация разыгрывается при значительном повреждении ткани, так как в них

присутствует недостаточное количество стволовых клеток. При действии экстремальных факторов, стрессе, повреждениях или травмах собственного резерва не хватает и происходит поступление МСК из центрального органа — костного мозга или депо, например, жировой ткани. Так, часть циркулирующих МСК после экспериментальной травмы способна рекрутироваться в мышечные, гладкомышечные и другие типы клеток, играя роль дополнительного пластического материала, достигающая области повреждения ткани. Стволовые клетки в кишечнике ведут себя так же, как и в других органах и тканях. Как и другие органы, кишечник служит «убежищем» для клеток костномозгового происхождения, и введенные МСК выполняют репаративные процессы в кишечнике. Они сливаются со стволовыми клетками кишечного эпителия, которые затем дифференцируются в зрелые энтеро- и колоноциты. Их обнаруживают и спустя 6–12 месяцев после трансплантации в собственной пластинке слизистой оболочки кишки. На перспективу применения МСК для лечения заболеваний с преимущественно аутоиммунным патогенезом указывает ряд экспериментальных работ по трансплантации костного мозга в моделях артрита и системной красной волчанки, результаты которых обсуждаются в литературе [12; 20].

Таким образом, трансплантация аллогенных МСК, а также их использование в целях иммуномодуляции, по-видимому, будут занимать одно из ведущих мест в будущих клинических исследованиях. В этом плане интересны полученные нами результаты изменения иммунного статуса больных язвенным колитом под влиянием лечения МСК.

Нарушения функциональной активности иммунной системы при язвенном колите (ЯК) проявляются повышенной циркуляцией цитокинов,

* — на цветной вклейке в журнал.

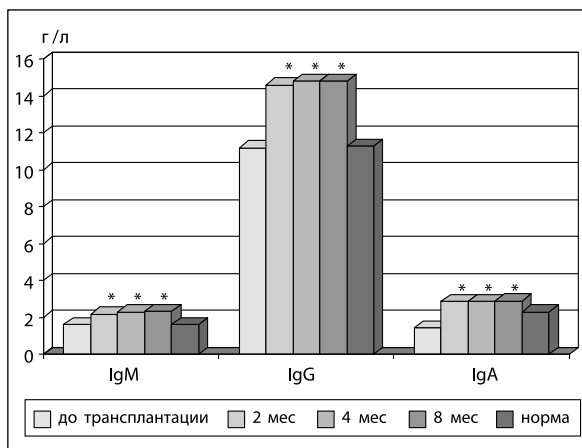


Рис. 4. Содержание Ig до и после введения МСК (* — $p < 0,05$)

иммуноглобулинов, аутоантител к субклеточным структурам цитоплазмы нейтрофилов, выраженной в различной степени в зависимости от вариантов течения, активности, стадии, продолжительности заболевания и проводимой терапии.

Вопрос о влиянии мезенхимальных стволовых клеток на функциональное состояние иммунной системы пациентов с ЯК в настоящее время практически не исследован. В связи с этим в ЦНИИГ было проведено комплексное сравнительное исследование по изучению влияния мезенхимальных стволовых клеток на иммунный статус при язвенном колите (ЯК). До и после трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли показатели гуморального иммунного статуса (цитокины, сывороточные и секреторные иммуноглобулины, аутологичные антитела и др.).

Хронические воспалительные заболевания кишечника (ХВЗК) — язвенный колит, болезнь Крона — сопровождаются повышенной циркуляцией цитокинов с различными функциональными свойствами. Продуцируемые Т-хелперами I и II типа, цитокины стимулируют как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, регулируют межклеточные коммуникации, развитие интегрированной реакции со стороны иммунной системы.

Максимальное увеличение концентрации цитокинов в сыворотке крови отмечено у пациентов с впервые выявленным заболеванием (в среднем $450 \pm 22,4$ – $790 \pm 36,6$ пг/мл, у здоровых лиц — $42,8 \pm 6,2$ пг/мл). Для пациентов с длительным прогрессирующим течением ЯК характерно стойкое, умеренное повышение содержания (140 ± 36 – 260 ± 84 пг/мл) ИЛ-12, ИФ- γ , ФНО- α , ИЛ-4 при минимальном увеличении (40 ± 10 – 110 ± 27 пг/мл) маркеров острой фазы (ИЛ-1 β , — 2, — 8, — 6).

С увеличением продолжительности заболевания, частоты рецидивов концентрация циркулирующих в кровотоке цитокинов уменьшалась,

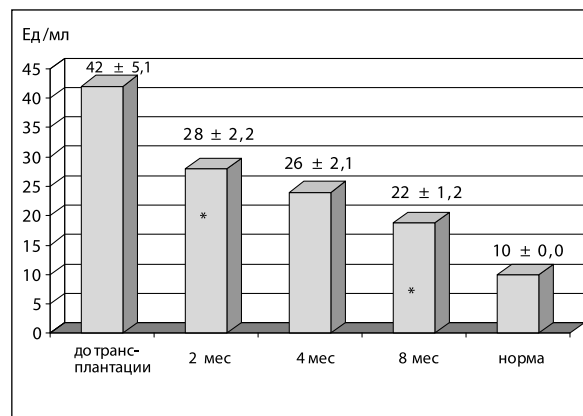


Рис. 5. Снижение аутоантител к нейтрофилам (BPI) у больных основной группы после введения МСК (* — $p < 0,05$)

что можно расценить как результат истощения, угнетения функциональной, в том числе и цитокинпродуцирующей, активности иммунокомпетентных клеток.

Стандартная терапия у большинства пациентов с ВЗК сопровождалась достоверным снижением увеличенного содержания сывороточных цитокинов по сравнению с уровнем, предшествующим лечению. При терапии 5-АСК содержание цитокинов у больных ЯК снижалось в среднем до 90–240 пг/мл. Внутривенное введение ремикейда (антитела к ФНО- α) больным ЯК приводило к достоверному снижению ($p < 0,05$) концентрации провоспалительных цитокинов — ФНО- α , ИЛ-1 β (до 55–70 пг/мл). Длительное применение иммунодепрессантов (кортикостероидов, цитостатиков) при прогрессирующем течении ЯК сопровождалось угнетением функциональной активности иммунной системы, снижением уровня цитокинов, иммуноглобулинов.

Таким образом, содержание сывороточных цитокинов при ЯК максимально повышено у пациентов с впервые выявленным заболеванием; снижается при терапии 5-АСК, ремикейдом и достигает минимальных значений при длительном применении иммунодепрессантной терапии.

Необходимо подчеркнуть, что у подавляющего большинства больных ЯК в исходном состоянии, непосредственно предшествующем трансплантации МСК, при наличии выраженных клинических, эндоскопических и гистологических проявлений содержание цитокинов, иммуноглобулинов в сыворотке крови снижено. Это обусловлено тяжелым прогрессирующим течением заболевания, длительным применением иммунодепрессантной терапии (кортикостероидов, цитостатиков), угнетением функциональной активности иммунной системы, развитием вторичного иммунодефицита.

Системная однократная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток таким больным сопровождалась достоверным увеличением сни-

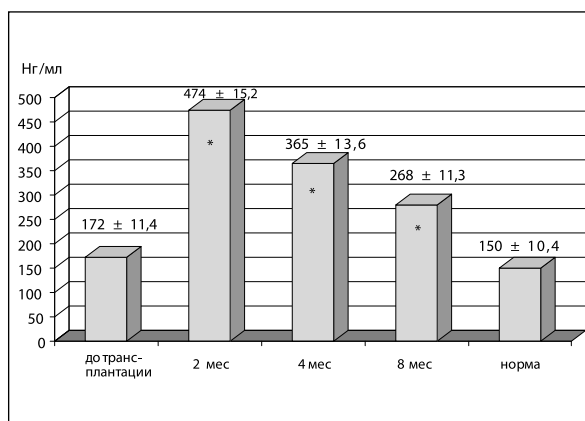


Рис. 6. Повышение уровня ферритина как показателя гибели введенных мезенхимальных стволовых клеток (* — $p < 0,05$)

женного уровня цитокинов (с 11,4 до 23,6 пг/мл), которое тем не менее оставалось ниже контрольных значений (42,8 пг/мл).

В развитии и течении хронических прогрессирующих воспалительных заболеваний кишечника важная роль принадлежит аутоиммунным реакциям, иммуноглобулинам и аутоантителам. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови больных ЯК до введения МСК и спустя 2, 4 и 8 месяцев соответственно составило: IgM — 0,9–1,6–2,18 и 2,3 г/л; IgG — 11,2–14,6–14,8 и 14,8 г/л; IgA — 1,82–2,6–3,2 и 3,8 г/л (в контроле IgM — 1,6, IgG — 11,3; IgA — 2,3 г/л) (рис. 4). При обследовании больных отмечено резкое снижение концентрации подклассов IgG преимущественно IgG 1, 2, 4.

Отражением системных гуморальных аутоиммунных реакций, развивающихся при ЯК, служит повышенная циркуляция аутоантител к антигенным структурам цитоплазмы нейтрофилов (миелопероксидазе, лактоферрину, BPI и др.). Следует отметить, что у больных ЯК концентрация аутоантител к антигенам цитоплазмы нейтрофилов оставалась повышенной (42–56 Е/мл, в контроле — 10 Е/мл) при использовании стандартной (5-АСК), иммунодепрессантной (кортикостероиды, цитостатики) и цитокиновой (ремикеид — антитела к ФНО- α) терапии.

Результаты проведенного нами исследования показали, что у больных язвенным колитом введение МСК вызвало достоверное снижение увеличенного содержания аутоантител к антигенам цитоплазмы нейтрофилов (IgG — BPI) с $42 \pm 2,8$ до $28 \pm 1,6$ Е/мл через 2 месяца. Через 4 и 8 меся-

цев концентрация аутоантител составила соответственно 26 и 22 Ед/л. Эти данные подтверждают снижение интенсивности системных гуморальных аутоиммунных реакций у больных ЯК после трансплантации МСК (рис. 5).

Значительное повышение уровня ферритина в сыворотке крови (с $172 \pm 9,8$ до $474 \pm 28,4$ нг/мл, в контроле — $160 \pm 10,4$ нг/мл) — результат повреждения, гибели клеток (в частности, вводимых стволовых клеток). Динамика уровня ферритина представлена на рис. 6.

ВЫВОДЫ

1. У 30 из 36 больных язвенным колитом через 2 месяца после трансплантации МСК отмечено ослабление клинической активности воспалительного процесса с $7,58 \pm 0,3$ до $1,55 \pm 0,3$ балла (по Rachmilevitz). За 8 мес наблюдения рецидив наступил у 8 из 36 больных. У остальных 28 больных удалось снизить дозу преднизолона в среднем с 30 до 5,5 мг/сут через 2 месяца после трансплантации МСК.

В группе сравнения за 8 мес наблюдения индекс клинической активности снизился с $7,65 \pm 0,4$ до $2,9 \pm 0,35$ балла. Дозу преднизолона удалось снизить лишь незначительно: в среднем с 30 до 25 мг/сут.

2. Индекс эндоскопической активности после трансплантации МСК снизился у больных язвенным колитом с $8,36 \pm 0,17$ до $0,76 \pm 0,15$ (в группе сравнения — с $5,96 \pm 0,03$ до $2,6 \pm 0,4$).

3. МСК оказывают разнонаправленный регулирующий эффект на воспалительный процесс при язвенном колите: стимулируют функциональную активность угнетенной иммунной системы, снижают интенсивность аутоиммунных реакций и активность иммунопатологических процессов.

4. Применение МСК позволило отменить у 18 (50%) из 36 больных язвенным колитом кортикостероиды за 4 месяца наблюдения, ограничившись применением препаратов 5-АСК.

5. Однократное введение МСК запускает механизм собственного иммунного саногенетического ответа.

6. Использование клеточной культуры МСК человека в лечении больных ВЗК не приводит к возникновению острых нежелательных реакций в ближайшем периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. А., Конопляников А. Г., Ерохин В. В. и др. Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулеза легких//Клеточная трансплантология. — 2007. — Т. 1. — С. 77–80.
2. Манукян Г. В., Ерамишанцев А. К., Сухих Г. Т. и др. Трансплантация фетальных клеток в лечении больных циррозом печени и портальной гипертензией//Гепатология. — 2004. — Т. 6. — С. 14–20.
3. 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//Вестн. РАМН. — 2004. — Т. 59, № 9. — С. 71–76.
4. Черных Е. П., Пальцев А. И., Старостина Н. М. и др. Аутологичные клетки костного мозга в комплексном лечении пациентов хроническими гепатитами и циррозом печени//Гепатология. — 2005. — Т. 1. — С. 30–36.
5. Шахов В. П., Карлов А. В., Хлусов И. А. Мезенхимальные стволовые клетки и остеогенез//Гений ортопедии. — 2003. — № 2. — С. 116–120.
6. Шахов В. П., Кокарев О. В., Попов С. В. и др. Феномен формирования мезенхимальных островков из клеток костного мозга мышей в системе in vitro//Бюлл. сиб. мед. — 2004. — № 1. — С. 60–62.
7. Шумаков В. И., Казаков Э. Н., Онищенко Н. А. и др. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда//Рос. кардиол. журн. — 2003. — № 5. — С. 42–50.
8. Aggarwal S., Pittenger M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses//Blood. — 2005. — Vol. 105, № 4. — P. 1815–1822.
9. Baniyas G., Sugawara K., Pagnini C. et al. The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease//Curr. Opin. Investig. Drugs. — 2003. — Vol. 4. — P. 1279–1286.
10. Battler A., Leor J. Stem cell and gene-based therapy. Frontiers in regenerative medicine. — L: Springer-Verlag, 2006.; Gnechi M., He H., Nicolas Noiseux N. et al.
11. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement//The FASEB J. — 2006. — Vol. 20. — P. 661–669.
12. Caplan A. I., Heckman J. D., Lennon D. P. et al. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions//Boyan B. D.//J. Orthop. Res. — 1999. — Vol. 17. — P. 246–255.
13. Chaudhari M., Cornelius J. G., Schatz D. et al. Pancreatic stem cells: a therapeutic agent that may offer the best approach for curing type 1 diabetes//Pediatr Diabetes. — 2001. — Vol. 2, № 4. — P. 195–202.
14. Deng W., Han Q., Liao L. et al. Long-term distribution of adult stem cells in different tissues after transplantation//Stem. Cell. Cell. Ther. — 2003. — Vol. 1. — P. 62–65.
15. Dennis J., Charbord P. Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma Stem//Cells. — 2002. — № 20. — P. 205–214.
16. Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. L. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue//Transplantation. — 1968. — Vol. 6, № 2. — P. 230–247.
17. Geboes K., Riddell R., Jensfelt B. et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis//Gut. — 2000. — Vol. 47. — P. 404–409.
18. Hawkey C. J. Stem cell transplantation for Crohn's disease//Best Pract. Res. Clin. Haematol. — 2004. — Vol. 17, № 2. — P. 317–325.
19. Hugot J. P., Chamaillard M., Zouali H. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease//Nature. — 2001. — Vol. 411. — P. 599–603.
20. Jayne D., Passweg J., Marmont A. et al. European Group for Blood and Marrow Transplantation; European League Against Rheumatism Registry. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus//Lupus. — 2004. — Vol. 13, № 3. — P. 168–176.
21. 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. — Vol. 101. — P. 3722–3729.
22. 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. — Vol. 32, № 3. — P. 337–340.
23. Makino S., Fukuda K., Mioshi S. et al. Cardiomyocytes can be regeneration from marrow stromal cells in vitro//J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103. — P. 697–705.
24. Oyama Y., Craig R. M., Traynor A. E. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease//Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128, № 3. — P. 552–563.
25. Stasi R., Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults//Mayo Clin. Proc. — 2004. — Vol. 79, № 4. — P. 504–522.
26. Tyndall A., Matucci-Cerinic M. Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of systemic sclerosis and other autoimmune disorders//Expert Opin Biol Ther. — 2003. — Vol. 3, № 7. — P. 1041–1049.
27. Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic beta cells: towards a cure for diabetes?//Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2002. — Vol. 296, № 5. — P. 1039–1043.