

УСПЕШНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНОГО С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ *

Лазебник Л. Б., Князев О. В., Парфенов А. И., Ручкина И. Н., Ефремов Л. И.

ЦНИИГ ДЗ г. Москва

Князев Олег Владимирович
11123 г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86
Тел.: (495) 304-30-52;
E-mail: oleg7@bk.ru

РЕЗЮМЕ

В статье приводится описание успешного применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в комплексной терапии больного гормонозависимым язвенным колитом.

Ключевые слова: клинический случай; язвенный колит; гормонозависимый; аллогенные мезенхимальные стволовые клетки.

SUMMARY

The article describes successful use of allogeneic mesenchymal stem cells in complex treatment of patients with enzymedependent ulcerative colitis.

Keywords: clinical cases, ulcerative colitis; enzymedepend; allogeneic mesenchymal stem cells.

Современное развитие биотехнологии позволяет рассматривать клетку не только как один из главных объектов лечебного воздействия, но и как средство лечения многих заболеваний. Так, для лечения сахарного диабета успешно используется трансплантация аллогенных фетальных и неонатальных ксеногенных культур островковых клеток поджелудочной железы, для лечения различных форм печеночной недостаточности применяются ксеногенные гепатоциты, терапия аллогенными фетальными клетками используется для лечения ожогов, миодистрофии Дюшена и т. д.

Дефицит фетального аллогенного материала, обладающего высокой биологической активностью, высокая антигенность ксеногенных клеток и опасность инфицирования при их использовании, а также существование биоэтических проблем его использования [Лопухин Ю. М., 2002] привели к проблеме использования в медицине аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток уже прочно вошла в практику онкологии, гематоло-

гии, травматологии, все шире становится их клиническое применение в кардиологии [3; 4; 6; 8; 15], артрологии [9], иммунологии [18], ревматологии [17], фтизиопульмонологии [1] и гепатологии [2, 5, 11].

Так, в одной из первых работ, опубликованной в 2003 году и посвященной трансплантации кроветворных стволовых клеток при болезни Крона, сообщается о результатах лечения 2 больных с тяжелой формой заболевания. У одной больной, 22-летней женщины, пришлось прибегнуть к удалению части толстого кишки, у нее возникли фистула, периаанальный сепсис и диарея до 25 раз в день. У второго больного, 16-летнего мальчика, заболевание прогрессировало в течение 6 лет, результатом чего стала необходимость в постоянном искусственном энтеральном питании. У обоих больных высокодозная иммуносупрессивная терапия с трансплантацией кроветворных стволовых клеток привела к полной ремиссии заболевания. Диарея полностью прекратилась, эндоскопическое исследование показало заживление язвенных дефектов [7; 12].

* Иллюстрации к статье на цветной вклейке в журнал.

Следует отметить, что трансплантация кроветворных стволовых клеток при хронических воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), как и при других заболеваниях, является сложным комплексным методом лечения. Ограниченные клинические испытания, проводившиеся во многих медицинских и научных центрах Европы и Америки, показали, что при лечении ВЗК методом трансплантации стволовых клеток в большинстве случаев удается достичь положительного эффекта даже без проведения иммуносупрессивной терапии. Процедура лечения хорошо переносится, и у большинства больных удается достичь устойчивой, а иногда и полной ремиссии заболевания [10; 14]. В настоящее время проводятся расширенные клинические испытания во многих клиниках Европы и США.

В нашем институте впервые трансплантация мезенхимальных стволовых клеток осуществлена больному с язвенным колитом в феврале 2008 года 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 после получения информированного согласия больного. Исследование проводится в рамках отраслевой программы «Новые клеточные технологии — медицине», утвержденной президиумом РАМН 29 мая 2002 года, и в соответствии с приказом МЗиСР РФ № 488 от 20 июля 2007 года, регламентирующим внедрение новых медицинских технологий.

Целью данной работы является выяснение эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток у больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Больной П., 1976 г. р., наблюдается в отделении патологии кишечника с мая 2006 года по поводу язвенного колита.

История жизни. Единственный ребенок в семье. Развитие без особенностей. Наследственность не отягощена. Курение до 20 сигарет в сутки. Образование среднее специальное. Работает телефонистом. Инвалидности не имеет.

История заболевания. Впервые понос с примесью крови появился в апреле 2006 г, частота стула постепенно нарастала и достигла до 15 раз в сутки, появилась ночная диарея и фебрильная лихорадка. Больной стал терять в весе, появились дискомфорт и боли в нижних отделах живота.

Госпитализирован в ГКБ № 20, где проводился посев кала для исключения кишечных инфекций. Из обследований: УЗИ органов брюшной полости — признаки хронического панкреатита. Больному назначались ферменты (мезим, креон) — без эффекта. Эндоскопическое исследование кишечника не проводилось. В связи с сохраняющимися поносами с примесью крови и лихорадкой больной с подозрением

на язвенный колит был переведен в отделение патологии кишечника ЦНИИГ, куда больной и поступил 12 мая 2006 года: состояние средней тяжести, нормостенического типа телосложения, пониженного питания (рост — 185 см, вес — 60 кг, ИМТ — 17). Кожные покровы и видимые слизистые бледные, на коже лица и спины *acne vulgaris*, периферические лимфоузлы не увеличены. В легких дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритм правильный, пульс — 96 в минуту. Живот симметричный, всеми отделами участвует в акте дыхания, при пальпации — мягкий, умеренно болезненный в левой подвздошной области, симптомов раздражения брюшины нет. Печень и селезенка не пальпируются. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон.

Проведено обследование. В клиническом анализе крови анемия: Нв — 98 г/л, гематокрит — 36,8; лейкоцитоз — $14,6 \cdot 10^9/\text{л}$, с палочкоядерным сдвигом до 12%, СОЭ — 28 мм/ч, в биохимическом анализе крови: сывороточное железо — 7,8 мкм/л, СРБ — 26,8 Ед/л. РРС от 13.05.08 г. (без подготовки). Тубус ректоскопа введен на 16 см (выше кишечное содержимое). Слизистая на осмотренном участке отечна, гиперемирована, множественные геморрагии, эрозии от 0,1 до 0,3 см в диаметре, выраженная контактная кровоточивость, сосудистый рисунок отсутствует. Заключение: эрозивно-геморрагический проктосигмоидит. Для уточнения протяженности поражения слизистой оболочки толстой кишки проведена колоноскопия (КС) — отек, гиперемия слизистой прямой, сигмовидной и восходящего отдела толстой кишки, множественные геморрагии, эрозии, выраженная контактная кровоточивость. Сосудистый рисунок отсутствует.

На основании клинической картины: диарейный синдром воспалительного характера (жидкий стул 15 раз в сутки с примесью слизи и крови, сопровождающийся болями в животе, гипертермией), данных колоноскопии: гиперемия и отек, сосудистый рисунок отсутствует, множественные геморрагии, эрозии, контактная кровоточивость — больному был установлен диагноз язвенный колит, впервые выявленный, левостороннее поражение, средней тяжести, умеренная активность.

Начата терапия: сульфасалазин 4 г/сут, преднизолон в микроклизмах 60 мг/сут. В течение 7 дней положительного эффекта не достигнуто — сохранялась диарея, лихорадка. В связи с отсутствием эффекта от лечения салицилатами назначена терапия метипредом (40 мг/сут), метрогил 200 мг/сут в/в капельно. На данной терапии положительная динамика: урежение частоты стула, уменьшение количества крови и слизи в стуле, нормализация температуры. Однако при попытке снизить дозу ме-



типреда до 24 мг/сут отмечена реактивация заболевания. Констатирована гормональная зависимость. Назначен азатиоприн 150 мг/сут. Амбулаторно больной препарат принимал нерегулярно, в связи с чем у него возникли повторные обострения с распространением процесса на всю толстую кишку. Проводилась повторная терапия глюкокортикостероидами (ГКС), после отмены которых наблюдалась реактивация заболевания. Последнее ухудшение в начале 2008 года. Госпитализирован в ЦНИИГ 7.02.08 с очередной атакой язвенного колита.

При поступлении жалобы на понос до 5–6 раз в сутки с примесью крови и слизи, в дневное и ночное время, субфебрильная температура в вечернее время, дискомфорт и боли в нижних отделах живота, метеоризм, снижение аппетита, похудание на 5 кг, слабость.

Состояние удовлетворительное, нормостенический тип телосложения (рост — 185 см, вес — 66 кг, ИМТ — 19). Кожные покровы и видимые слизистые бледные, на коже лица и спины *acne vulgaris*, периферические лимфоузлы не увеличены. В легких дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритм правильный, пульс — 76 в минуту. АД — 120/80 мм рт. ст. Живот симметричный, всеми отделами участвует в акте дыхания, при пальпации — мягкий, умеренно болезненный в левой подвздошной области, симптомов раздражения брюшины нет. Печень и селезенка не пальпируются.

Индекс клинической активности по Rachmilevitz (до трансплантации МСК) — 7. В ОАК: лейкоциты — $12,2 \cdot 10^9/\text{л}$, палочкоядерные нейтрофилы — 14%, СОЭ — 25 мм/час. В биохимическом анализе крови СРБ — 21,9 Ед/л.

Инструментальные исследования. Колоноскопия от 8.02.2008: слизистая оболочка толстой кишки на всем протяжении резко гиперемирована, отечна. 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. Контактная кровоточивость умеренная. Заключение: эндоскопическая картина язвенного колита, тотальное поражение, умеренная активность (рис. 1). Индекс эндоскопической активности по Rachmilevitz — 8.

Взята биопсия: количество бокаловидных клеток уменьшено, наблюдалось увеличение количества межэпителиальных лимфоцитов и усиление диффузной лимфоплазмочитарной инфильтрации собственной пластинки; в отдельных случаях наблюдались крипт-асцессы; клетки эпителия находились в состоянии выраженной дистрофии и некробиоза (рис. 2 а, б).

Клинический диагноз: язвенный колит, тотальное поражение, хроническое рецидивирующее течение, гормонозависимая форма, умеренная активность.

Начато стандартное лечение: метипред 40 мг/сут, преднизолон 60 мг/сут местно в микроклизмах, азатиоприн 150 мг/сут. Состояние больного без положительной динамики, в связи с чем было принято решение о трансплантации МСК: непрерывно рецидивирующий характер течения язвенного колита, зависимость к глюкокортикостероидам, высокий риск развития осложнений от длительного приема ГКС (СД, катаракта, стероидные язвы и пр.) и азатиоприна (лейкопения с развитием инфекционных осложнений — системный кандидоз, ЦМВ, активация условно-патогенной флоры и пр.), возраст больного — 32 года и отсутствие сопутствующей патологии. Азатиоприн был отменен.

Документы, регламентирующие трансплантацию МСК:

1. Регистрационное удостоверение № ФС-2006/206 от 11 августа 2006 года «Метод выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток».
2. Протокол I фазы ограниченных клинических испытаний метода системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека у больных с болезнью Крона и язвенным колитом (утвержден Ученым советом ЦНИИГ 27.12.2007 г.).
3. Положительное решение локального комитета по этике при ЦНИИГ от 11 февраля 2008 г.
4. Информированное согласие пациента об участии в исследовании.

Через 2 месяца после системной трансплантации $200 \cdot 10^{12}$ аллогенных мезенхимальных стволовых клеток у больного отмечен положительный клинический эффект: улучшение общего состояния, урежение частоты стула до 1–2 раз в сутки, улучшение его консистенции, значительное уменьшение, а в последующем купирование болевого синдрома, исчезновение слабости и недомогания, нормализация температуры тела, увеличение массы тела на 5 кг. Индекс клинической активности язвенного колита снизился до 0. В течение этого периода были полностью по схеме отменены ГКС, в качестве поддерживающей терапии больной принимает пробиотики.

Проведена контрольная КС (29.04.08): баугиниева заслонка полиповидной формы, сомкнута, ориентирована в купол. Слизистая слепой, восходящей, поперечно-ободочной и дистального отдела сигмовидной кишок очагово гиперемирована. Сосудистый рисунок сглажен. Складки нормальной высоты. Слизистая остальных отделов розовая, гладкая, блестящая. Сосудистый рисунок усилен, перестроен. Определяются единичные псевдополипозные разрастания до 0,3 см в диаметре. Контактная кровоточивость отсутствует. Заключение: неспецифический колит, ремиссия (рис. 3). Индекс эндоскопической активности составил 1.

По результатам гистологического исследования также отмечалась значительная положительная динамика:

определялась резкая активизация пролиферативных процессов, с гиперплазией эпителия и усилением образования мелких и крупных фолликулов в слизистой оболочке и подслизистом слое, увеличением количества бокаловидных клеток в эпителии слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с исходным уровнем (рис. 4 а). Лишь в базальных отделах слизистой оболочки сохранялись небольшие фолликулоподобные скопления лимфоцитов (рис. 4 а, б).

У больного на момент введения МСК отмечались воспалительные изменения в клиническом анализе крови: лейкоцитоз с увеличением палочкоядерной фракции, увеличение СОЭ до 27–42 мм/ч. Через 2 месяца после трансплантации стволовых клеток показатели периферической крови улучшились: нормализовалось количество лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, СОЭ снизилась до 3–20 мм/ч. В биохимическом анализе крови у больного отмечался повышенный уровень СРБ до 38,7 мкмоль/л (в среднем до 20,1 мкм/л), после трансплантации МСК отмечалось его снижение до субнормальных цифр — в среднем до 10,3 мкмоль/л.

В настоящее время больной продолжает наблюдаться в ЦНИИГ: ежемесячно проводится оценка клинического течения язвенного колита, осуществляется контроль биохимического и клинического анализа крови.

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 складывается при значительном повреждении ткани, т. к. в них присутствует недостаточное количество стволовых клеток. При

действии экстремальных факторов, стрессе, повреждениях или травмах собственного резерва не хватает, и происходит мобилизация МСК из центрального органа — костного мозга или депо, например жировой ткани. Так, часть циркулирующих МСК после экспериментальной травмы способны рекрутироваться в мышечные, гладкомышечные и другие типы клеток, играя роль дополнительного пластического материала, достигая 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 [13]. Их обнаруживают и спустя 6–12 месяцев после трансплантации в *lamina propria*.

В нашем случае донорские МСК обеспечивали как репаративный потенциал слизистой оболочки толстой кишки, так и противовоспалительный эффект, позволивший отменить азатиоприн, глюкокортикостероиды и 5-АСК.

Таким образом, первые результаты трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) больному язвенным колитом показали, что этот метод является безопасным и эффективным средством терапии. МСК оказывают противовоспалительное действие и стимулирующий репаративный эффект на слизистую оболочку толстой кишки.

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//Клеточн. трансплантол. — 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. — 14–20.
3. Попов С. В., Кострикин А. А., Шахов В. П. Перепрограммирование мультипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты//Вестн. аритмол. — 2004. — № 35, Прилож. А. — С. 582.
4. Потапов И. В., Онищенко Н. А., Крашенинников М. Е. Клеточная кардиомиопластика//Вестн. трансплантол. и иск. органов. — 2001. — № 2. — С. 54–62.
5. 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.
6. 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.
7. Baniai 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.
8. Brittan M., Hunt T., Jeffery R. et al. Bone marrow derivation of pericycral myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. — Gut 2002. — Vol. 50. — P. 752–757.
9. Hanff G., Abrahamsson S. O. Matrix synthesis and cell proliferation in repaired flexor tendons within e-PTFE reconstructed flexor tendon sheaths//J. Hand. Surg. — 1996. — № 21. — P. 642–646.
10. Hawkey C. J. Stem cell transplantation for Crohn's disease. Best Pract Res Clin. Haematol. — 2004. — Vol. 17, № 2. — P. 317–325.
11. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K. et al. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages//Hepatol. — 2004. — Vol. 39, № 3. — P. 667–675.
12. 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.
13. Matsumoto T., Okamoto R., Yajima et al. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine//Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128. — P. 1851–1867.
14. 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.
15. Pettinger M. F., Martin B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics//Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 9–20.
16. Scime R., Cavallaro A. M., Tringali S. et al. Complete clinical remission after high-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in severe Crohn's disease refractory to immunosuppressive and immunomodulator therapy//Inflamm. Bowel Dis. — 2004. — Vol. 10. — P. 892–894.
17. Snowden J. A., Passweg J., Moore J. J. et al. Autologous hemopoietic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: a report from the EBMT and ABMTR//J. Rheumatol. — 2004. — Vol. 31, № 3. — P. 482–488.
18. Stasi R., Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults//Mayo Clin. Proc. 2004. — Vol. 79, № 4. — P. 504–522.