

Использование мезенхимальных стволовых клеток в комплексной терапии язвенного колита

О.В. КНЯЗЕВ¹, А.И. ПАРФЕНОВ¹, А.Г. КОНОПЛЯННИКОВ², О.Н. БОЛДЫРЕВА¹

¹ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр» Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия; ²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Обнинск, Россия

Use of mesenchymal stem cells in the combination therapy of ulcerative colitis

O.V. KNYAZEV¹, A.I. PARFENOV¹, A.G. KONOPLYANNIKOV², O.N. BOLDYREVA¹

¹Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia; ²A.F. Tsyb Medical Radiology Research Center, Branch, National Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

Резюме

Цель исследования. Сравнение результатов лечения больных с обострением среднетяжелой и тяжелой форм язвенного колита (ЯК), получающих стандартную противовоспалительную терапию (2-я группа) и комплексную противовоспалительную терапию с применением культуры аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга (1-я группа).

Результаты. Включение МСК в комплексную терапию острой атаки ЯК не повлияло на частоту рецидивов, продолжительность ремиссии и средний уровень индексов клинической и эндоскопической активности в течение 1 года наблюдения: в 1-й группе рецидив ЯК произошел у 2 (16,7%) больных, во 2-й группе — у 3 (30%). Относительный риск (ОР) составил 0,3 (при 95% доверительном интервале — ДИ от 0,08 до 1,36; $p=0,2$; $\chi^2=1,47$). Индекс Рахмилевича в 1-й группе больных составил $3,33\pm 0,54$ балла, во 2-й — $4,4\pm 1,13$ балла ($p=0,81$), индекс Мейо — $3,1\pm 0,85$ и $3,9\pm 1,06$ балла соответственно ($p=0,66$). За 2 года наблюдения риск рецидива ЯК в 1-й группе в 3 раза ниже, чем во 2-й группе ($p=0,03$). Средняя продолжительность ремиссии в 1-й группе составила 22 мес, во 2-й группе — 17 мес ($p=0,049$). Через 3 года наблюдения продолжительность ремиссии в 1-й и 2-й группах составила 22 и 20 мес соответственно ($p=0,66$). Индекс Рахмилевича в 1-й группе больных составил $4,75\pm 1,13$ балла, во 2-й — $8,1\pm 1,1$ балла ($p=0,001$).

Заключение. Введение культуры МСК повышает эффективность противовоспалительной терапии у больных с острой формой ЯК.

Ключевые слова: биологическая терапия, воспалительные заболевания кишечника, мезенхимальные стволовые клетки, язвенный колит.

Aim. To compare results of treatment in patients with moderate and severe ulcerative colitis (UC), receiving standart anti-inflammatory therapy (second group) and its combination with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) (first group).

Results. Complex therapy of UC acute flare-up, including MSC did not influence on recurrence frequency, remission duration and mean value of clinical and endoscopic activity indices during 1 year of follow-up: in 1 group UC flare-up occurred in 2 (16.7%) patients, in 2 group — in 3 patients (30%). RR was 0.3 (95% CI 0.08—1.36; $p=0.2$; $\chi^2=1.47$). After 2 years of follow-up risk of UC exacerbation in 1 group was 3 times lower than in the 2 group ($p=0.03$). Mean duration of remission in the 1 group was 22 months, in the 2 group — 17 months ($p=0.049$). After 3 years of follow-up remission duration in the 1 and 2 groups were 22 and 20 months, respectively ($p=0.66$). Activity Index according to Rachmilevich in the 1 group was 4.75 ± 1.13 points, in the 2 — 8.1 ± 1.1 points ($p=0.001$).

Conclusion. MSC application increases efficacy of anti-inflammatory treatment in patients with acute exacerbation of UC.

Keywords: biological therapy, inflammatory bowel diseases, mesenchymal stem cells, ulcerative colitis.

5-АСК — 5-аминосалициловая кислота
ВЗК — воспалительные заболевания кишечника
ГИБП — генно-инженерные биологические препараты
ГКС — глюкокортикостероиды
ДИ — доверительный интервал

МСК — мезенхимальные стволовые клетки
ОР — относительный риск
СК — стволовые клетки
СОТК — слизистая оболочка толстой кишки
ЯК — язвенный колит

Язвенный колит (ЯК) — хроническое заболевание, характеризующееся иммунным диффузным воспалением слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) с обязательным вовлечением в воспалительный процесс пря-

мой кишки [1]. Современные эпидемиологические исследования свидетельствуют о значительном росте заболеваемости ЯК. В экономически развитых странах заболеваемость ЯК составляет до 30 человек на 100 000

населения, причем пик приходится на возрастную период от 20 до 40 лет [2].

Выбор вида консервативного или хирургического лечения определяется тяжестью обострения, протяженностью поражения толстой кишки, наличием внекишечных проявлений, длительностью заболевания, эффективностью и безопасностью ранее проводившейся терапии, а также риском развития осложнений ЯК.

Цель терапии ЯК состоит в достижении ремиссии при условии прекращения приема глюкокортикостероидов (ГКС). Для поддержания ремиссии больной должен продолжать противорецидивную терапию [3, 4]. Тем не менее у 50% больных ЯК рецидивирует в течение 1-го года после установления диагноза, ремиссия в течение 3–7 лет сохраняется лишь у ¼ больных, а ежегодные рецидивы наблюдаются у 1/5 из них. Только у 50% больных после первого обострения ЯК ремиссия сохраняется на протяжении 5 лет. Примерно 20% больных переносят колэктомия в течение 10 лет, 30% — в течение 25 лет. В среднем хирургические вмешательства при ЯК выполняются у 10–20% пациентов [5].

Появление генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) значительно повлияло на продолжительность ремиссии, частоту развития рецидивов и осложнений ЯК. Внедрение в лечебную практику препарата инфликсимаба позволило эффективнее преодолевать гормонорезистентность и гормонозависимость ЯК, увеличить продолжительность безрецидивного периода, снизить риск развития рецидива, уменьшить частоту хирургических вмешательств и значительно улучшить качество жизни больных [6]. Однако остается нерешенным вопрос о продолжительности поддерживающей терапии ГИБП. У 1/3 пациентов с ЯК, получающих ГИБП в течение 1 года, в среднем через 4 мес после прекращения терапии происходил рецидив заболевания [7]. Поэтому остается актуальным поиск новых методов лечения больных ЯК.

Перспективной тактикой стало применение стволовых клеток (СК) в комплексной терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). В настоящее время лечение СК не является частью стандартной медицинской помощи и, как правило, выполняется только в рамках клинических испытаний. Для терапии ВЗК используются мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и гемопоэтические стволовые клетки. В настоящее время зарегистрировано 38 клинических исследований по оценке эффективности и безопасности МСК для лечения больных ЯК и болезни Крона (18 — в США, 4 — в Канаде, 13 — в Европе, 3 — в Китае, 4 — в странах Ближнего Востока, 5 — в Австралии). Следует отметить, что из всех исследований только 3 проводятся с набором больных ЯК.

МСК обладают иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами и большим регенератив-

ным потенциалом, что делает их привлекательными для клинического применения [8]. Использование МСК рассматривается как вариант лечения для свищевой и люминальной формы болезни Крона [9, 10]. В 2012 г. опубликованы результаты метаанализа контролируемых исследований (выполненных до 2011 г.), в которых использовались культуры МСК при различных заболеваниях, а также с участием здоровых добровольцев. Основываясь на результатах клинических исследований, трансфузии МСК можно считать безопасным методом лечения. Ни в одном случае не сообщалось о злокачественной трансформации после трансфузии МСК. Будущие клинические исследования должны быть направлены на дальнейшую оценку эффективности и безопасности трансфузии МСК.

Цель работы — сравнить результаты лечения больных с обострением среднетяжелой и тяжелой форм ЯК, получающих стандартную противовоспалительную терапию и комплексную противовоспалительную терапию с применением культуры МСК костного мозга.

Материалы и методы

Больных с острой формой ЯК (менее 6 мес от дебюта заболевания) разделили на 2 группы. Больные ЯК 1-й группы ($n=12$) помимо стандартной противовоспалительной терапии [1] получили культуру МСК по схеме 0, 1-я и 26-я недели, затем в последующие годы наблюдения каждые 6 мес. Больные 2-й группы ($n=10$) получали стандартную противовоспалительную терапию препаратами 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) и ГКС.

Возраст больных 1-й группы составил от 22 до 44 лет (медиана 29 лет); 58,3% женщин. Возраст больных 2-й группы находился в пределах от 19 до 54 лет (медиана 36 лет); 60% женщин, 40% мужчин.

Тяжесть ЯК оценивали по критериям S. Truelove и L. Witts. В 1-й группе 58,3% составляли больные с тяжелой формой обострения ЯК, во 2-й группе 60% больных с тяжелой формой обострения ЯК, с обострением средней степени тяжести — 41,7 и 40% соответственно.

В 1-й группе тотальный колит констатирован у 33,3%, во 2-й группе — у 40% больных, левосторонний колит — у 66,7 и 60% соответственно. Больных с проктитом в исследование не включали.

Больным 1-й группы снижали дозу ГКС до 0,5 мг на 1 кг массы тела и осуществляли системное введение МСК в дозе 1,5–2 млн клеток на 1 кг массы тела по схеме 0, 1-я и 26-я недели. Через 3–5 дней после введения дозу ранее назначенных ГКС (не более 30 мг/сут) снижали в течение 6–8 нед до полной отмены. В дальнейшем в отсутствие рецидива заболевания больные получали поддерживающую терапию препаратами 5-АСК и/или пробиотиками. Больные 2-й группы получали стандартную терапию в соответствии с международными рекомендациями [1].

Дата введения культуры клеток являлась точкой включения в клиническое исследование. Критерием эффективности терапии служило безрецидивное течение заболевания в течение 12 мес. Клиническую активность ЯК оценивали по шкале Рахмилевича, эндоскопическую — по шкале Мейо с использованием видеосистемы фирмы «Фуджинон» EVE W-88A.

Контроль за динамикой клинических, лабораторных и эндоскопических показателей осуществляли через 2, 6 и 12 мес, затем ежегодно на протяжении 3 лет.

В 1-й группе исходный индекс Рахмилевича составил $9,66 \pm 0,43$ балла, во 2-й — $10,1 \pm 0,52$ балла ($p=0,43$), индекс Мейо — $7,66 \pm 0,37$ и $7,3 \pm 0,39$ балла соответственно ($p=0,084$).

Контактная информация:

Парфенов Асфольд Иванович — д.м.н., проф., зав. отд. патологии кишечника; 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86; e-mail: asfold@mail.ru

Сведения об авторах:

Князев Олег Владимирович — д.м.н., зав. отд-нием воспалительных заболеваний кишечника; e-mail: oleg7@bk.ru

Конопляников Анатолий Георгиевич — д.м.н., проф., зав. отд-нием клеточной и экспериментальной лучевой терапии; e-mail: konopl@obninsk.ru

Болдырева Оксана Николаевна — н.с. отд-ния воспалительных заболеваний кишечника

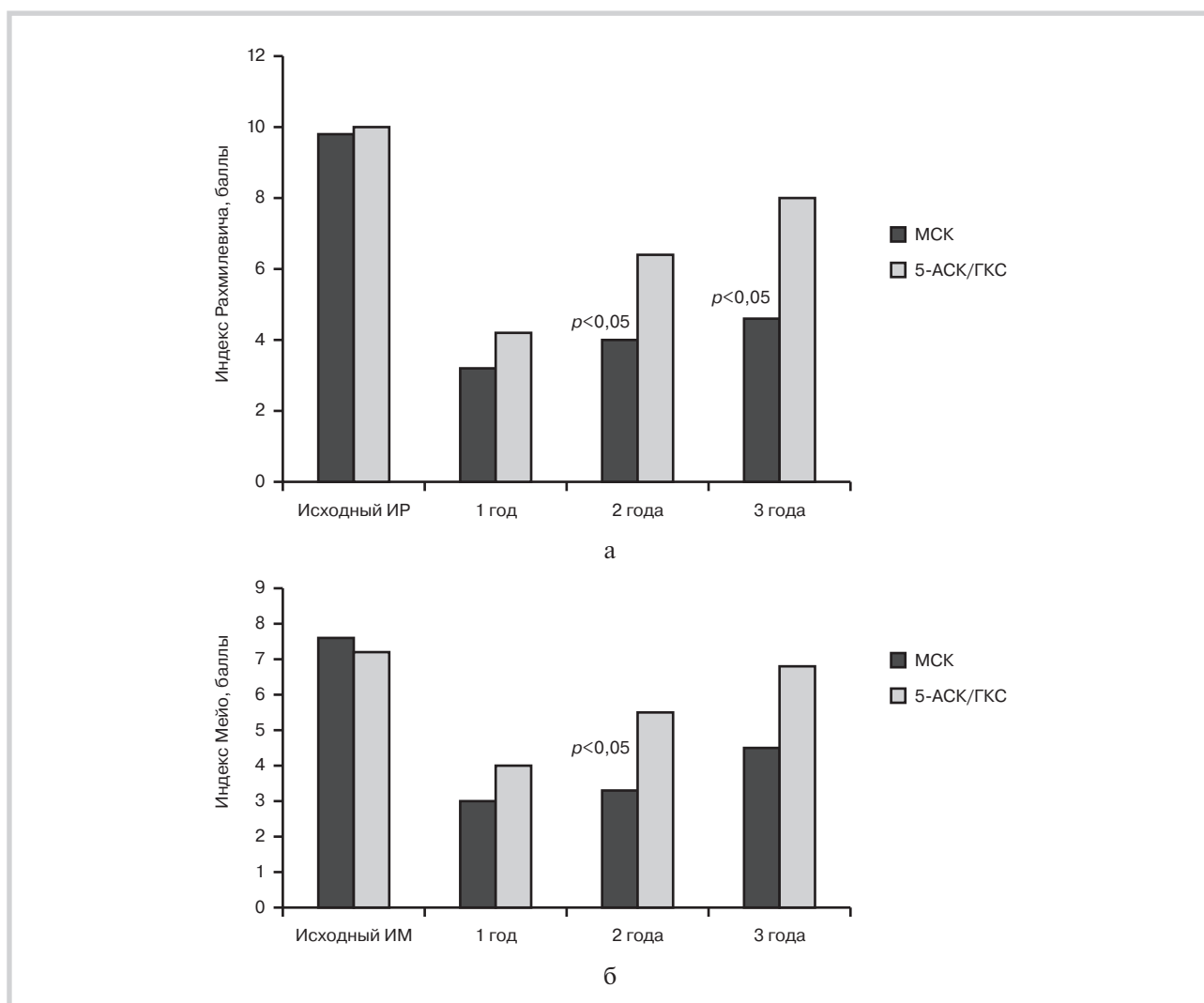


Рис. 1. Динамика индекса Рахмилевича (а) и индекса Мейо (б) в группах больных ЯК за 3 года наблюдения.

Клиническое наблюдение за больными осуществляли, начиная от даты введения МСК, на протяжении 36—40 мес.

Метод получения и размножения аутогенных МСК в необходимом для системной трансфузии МСК количестве разрешен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития МЗиСР РФ (лицензия ФС-2006/206) [11]. Донор перед процедурой подписывал «Приложение к заявлению о согласии участвовать в качестве донора костного мозга в проводимых в ГУ МРНЦ МЗиСР медицинских исследованиях по созданию культуры кардиомиоцитов из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и дальнейшему использованию культуры клеток в научных целях».

Культуру МСК вводили капельно внутривенно в дозе 1,5—2 млн на 1 кг массы тела. Для осуществления системной трансфузии 120—160 млн аллогенных МСК, размноженных в культуре, клетки взвешивали в 200 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, содержащего гепарин в концентрации 50 ЕД/мл, и через капельницу вводили пациенту в течение 40—60 мин. Премедикацию с целью профилактики трансфузионных реакций и осложнений осуществляли введением 30 мг преднизолона и/или 2 мл супрастина внутривенно.

Перед введением культуры МСК больные подписывали информированное согласие на участие в настоящем исследовании.

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики, достоверность различий

определяли с помощью критерия Вилкоксона для сравнения двух величин. При оценке продолжительности ремиссии использовали метод Каплана—Майера. Точкой начала отсчета считали дату включения в исследование, точкой окончания отсчета — дату последнего наблюдения, «отрицательным событием» — рецидив заболевания. Использовали пакет прикладных программ Microsoft Office Excel 2003; Statistica v.6,0; Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998.

Результаты и обсуждение

Через 1 год от начала исследования в 1-й группе больных рецидив ЯК произошел у 2 (16,7%), во 2-й группе — у 3 (30%). Относительный риск (ОР) развития рецидива у больных, получивших МСК, по сравнению с больными, получавшими 5-АСК/ГКС, в течение 1 года составил 0,3 (при 95% доверительном интервале — ДИ от 0,08 до 1,36; $p=0,2$; $\chi^2=1,47$). Индекс Рахмилевича в 1-й группе больных был равен $3,33 \pm 0,54$ балла, во 2-й — $4,4 \pm 1,13$ балла ($p=0,81$), индекс Мейо — $3,1 \pm 0,85$ и $3,9 \pm 1,06$ балла соответственно ($p=0,66$) (рис. 1). При сравнении кривых вероятности безрецидивного течения у больных с острой формой ЯК в течение 1 года наблюдения различий по продол-

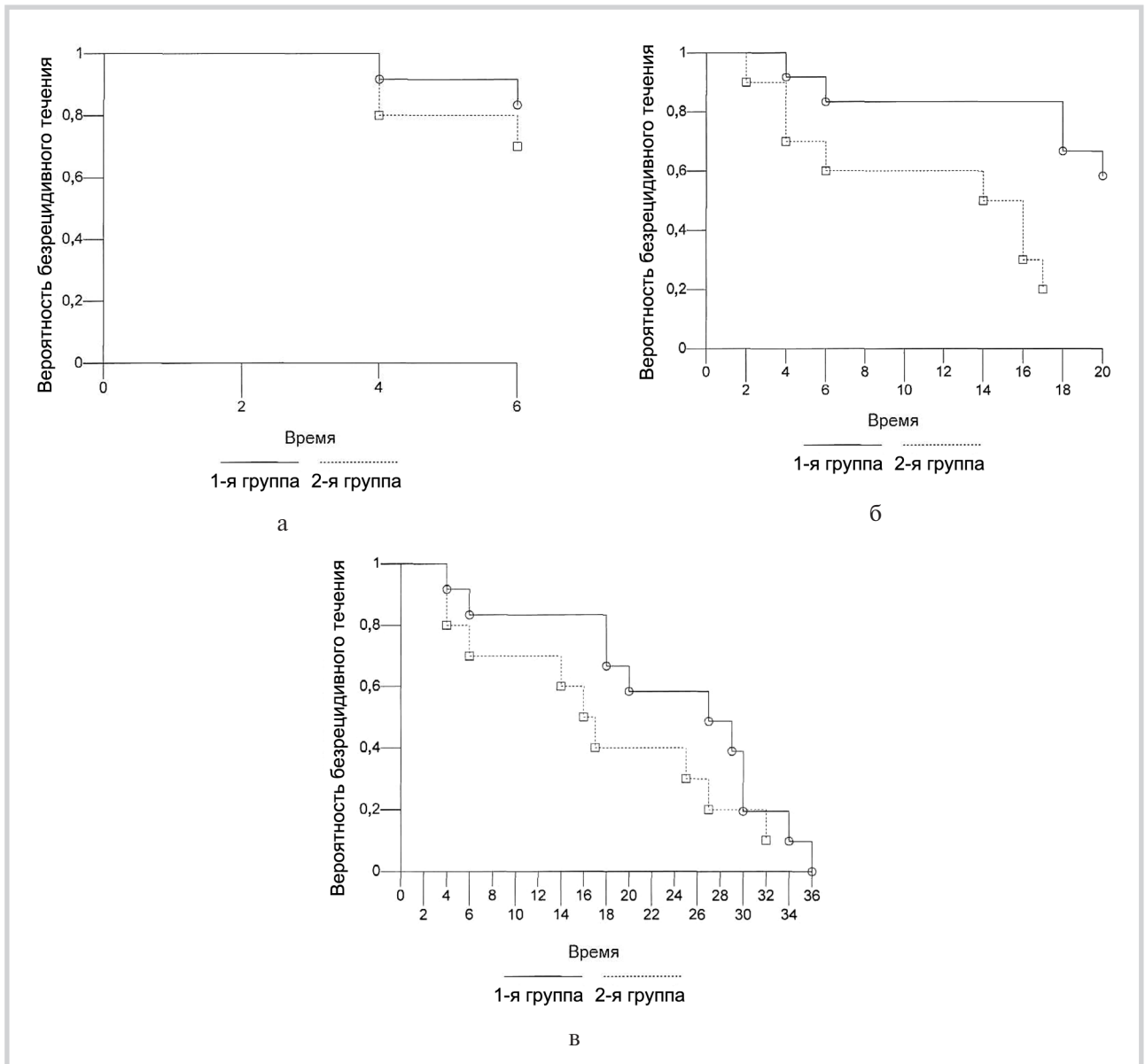


Рис. 2. Кривая Каплана—Мейера продолжительности ремиссии (до обострения ЯК в течение 1 года (а), 2 лет (б) и 3 лет (в) наблюдения в группах больных ЯК.

жительности ремиссии в группах больных также не отмечено: в 1-й группе около 11 мес, во 2-й около 10 мес ($p=0,76$) (рис. 2, а). Таким образом, проведенный нами анализ продемонстрировал, что в течение 1-го года наблюдения включение МСК в комплексную терапию острой формы ЯК не повлияло на частоту рецидивов, продолжительность ремиссии и средний уровень индексов клинической и эндоскопической активности ЯК.

За 2 года наблюдения результаты наблюдения оказались иными. Рецидив ЯК в 1-й группе произошел у 5 (41,6%) пациентов, а во 2-й — у 6 (60%). ОР развития рецидива ЯК через 2 года наблюдения составил 0,31 (при 95% ДИ от 0,11 до 0,87; $p=0,03$; $\chi^2=4,58$). Таким образом, риск обострения ЯК в течение 2 лет наблюдения достоверно в 3 раза ниже в группе больных, получающих МСК.

Индекс Рахмилевича в 1-й группе больных составил $4,1 \pm 0,96$ балла, во 2-й — $6,5 \pm 1,1$ балла ($p=0,049$), индекс Мейо — $3,41 \pm 1,01$ и $5,6 \pm 1,06$ балла соответственно ($p=0,038$) (см. рис. 1). При сравнении кривых вероятности безрецидивного течения за 2 года наблюдения у больных 1-й группы средняя продолжительность ремиссии составила 22 мес, у больных 2-й группы — 17 мес ($p=0,049$) (см. рис. 2, б).

Через 3 года наблюдения в 1-й группе ремиссия ЯК сохранялась у 50% больных, во 2-й группе — только у 10%. Однако при расчете риска развития рецидива ЯК результаты, полученные через 3 года наблюдения, оказались статистически незначимыми: ОР 1,67 (при 95% ДИ от 0,18 до 15,8; $p=0,086$; $\chi^2=0,03$). Для большей статистической значимости результатов, видимо, требуются большие число

случаев и продолжительность наблюдения. Следует отметить, что индекс Рахмилевича в 1-й группе больных ЯК составил $4,75 \pm 1,13$ балла, а во 2-й группе — $8,1 \pm 1,1$ балла ($p=0,001$), однако индекс Мейо через 3 года наблюдения статистически значимо не различался в зависимости от метода терапии ЯК — $4,66 \pm 1,1$ и $6,8 \pm 1,39$ балла соответственно ($p=0,14$) (см. рис. 1). При сравнении кривых вероятности безрецидивного течения через 3 года наблюдения у больных ЯК 1-й и 2-й групп статистически значимых различий по продолжительности ремиссии также не отмечено ($p=0,66$): и в первом и во втором случае она составила 22 и 20 мес соответственно (см. рис. 2, в).

Эти результаты дают основание считать, что у больных сохранялась в большей степени клиническая ремиссия, отражением которой является индекс Рахмилевича. Частота более надежной ремиссии, при которой достигается заживление СОТК, согласно индексу Мейо, в обеих группах больных примерно одинаковая. Тем не менее необходимо заметить, что около 50% больных 1-й группы не проводили поддерживающую терапию с введением МСК каждые 6 мес, как им было рекомендовано, и это могло повлиять на заживление СОТК.

Заключение

Сравнение результатов лечения больных с острой формой ЯК показали, что трансфузии МСК повышают

эффективность противовоспалительной терапии, способствуют увеличению продолжительности ремиссии заболевания, снижают в 3 раза риск повторного обострения ЯК за 2 года наблюдения.

Установлено, что одно-, двукратное введение МСК не позволяет обеспечить длительное поддержание ремиссии ЯК и требует регулярного введения, частоту которого предстоит определить.

Как показали наши исследования, одним из предикторов эффективности биологической терапии ГИБП являются непродолжительный анамнез ЯК и лечение, начатое в наиболее ранние сроки заболевания [9]. Раннее включение в комплексную терапию культуры МСК позволяет повысить эффективность традиционной терапии ВЗК. Трансфузия МСК уменьшает системную и топическую (в СОТК) продукцию провоспалительных цитокинов [12]. Известно также, что МСК обладают способностью обеспечивать восстановление чувствительности к предварительно неэффективной терапии аутоиммунных заболеваний [13].

На основании изложенного трансфузию аллогенных МСК костного мозга можно отнести к перспективному методу терапии острой формы ЯК.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом. *Колопроктология*. 2013;45(3):4-38.
2. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*. 2013;6:33-47. doi:10.4137/cgast.s12731.
3. Халиф И.Л. Принципы лечения язвенного колита (рекомендации российской группы по изучению воспалительных заболеваний кишечника). *Колопроктология*. 2006;2:31-33.
4. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 2: Current management. *J Crohn's, Colitis*. 2012;6(10):991-1030. doi:10.1016/j.crohns.2012.09.002.
5. Воробьев Г.И., Халиф И.Л. *Неспецифические воспалительные заболевания кишечника*. М.: Миклош; 2008.
6. Князев О.В., Чурикова А.А. Антицитокиновая терапия и качество жизни больных воспалительными заболеваниями кишечника. *Доказательная гастроэнтерология*. 2014;2:17-23.
7. Farkas K, Lakatos PL, Nagy F, Szepes Z, Miheller P, Papp M, Palatka K, Bálint A, Bor R, Wittmann T, Molnár T. Predictors of relapse in patients with ulcerative colitis in remission after one-year of infliximab therapy. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48(12):1394-1398. doi:10.3109/00365521.2013.845906.
8. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol*. 2009;183(12):7787-7798. doi:10.4049/jimmunol.0902318.
9. Князев О.В., Парфенов А.И., Шербаков П.Л., Ручкина И.Н., Конопляников А.Г. Клеточная терапия рефрактерных форм болезни Крона. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2013;3:145-152.
10. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(6):788-798. doi:10.1136/gut.2010.214841.
11. Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. *Вестник Российской Академии медицинских наук*. 2004;59(9):71-76.
12. Князев О.В., Парфенов А.И., Ручкина И.Н., Конопляников А.Г., Дроздов В.Н., Сагынбаева В.Э., Ивкина Т.И. Новые возможности преодоления вторичной неэффективности антицитокиновой терапии у больных воспалительными заболеваниями кишечника. *Терапевтический архив*. 2013;85(2):57-60.
13. Oyama Y, Traynor AE, Barr W, Burt RK. Allogeneic stem cell transplantation for autoimmune diseases: nonmyeloablative conditioning regimens. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:81-83.

Поступила 28.05.2015