

## Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга и азатиоприн в терапии болезни Крона

О.В. КНЯЗЕВ<sup>1</sup>, А.В. КАГРАМАНОВА<sup>1</sup>, Н.А. ФАДЕЕВА<sup>1</sup>, А.А. ЛИШИНСКАЯ<sup>1</sup>, О.Н. БОЛДЫРЕВА<sup>1</sup>, К.К. НОСКОВА<sup>1</sup>, Р.Б. ГУДКОВА<sup>1</sup>, А.Г. КОНОПЛЯННИКОВ<sup>2</sup>, А.И. ПАРФЕНОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения Москвы», Москва, Россия;

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

### Резюме

**Цель исследования.** Оценить эффективность терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга у пациентов с болезнью Крона (БК), получающих азатиоприн (АЗА).

**Материалы и методы.** В исследование включены 34 пациента с воспалительной (люминальной) формой БК. 1-я группа больных ( $n=15$ ) получала противовоспалительную терапию с применением культуры МСК в комбинации с АЗА. 2-я группа ( $n=19$ ) получала МСК без АЗА. Тяжесть атаки оценивали в баллах в соответствии с индексом активности БК (ИАБК). В сыворотке крови исследовали иммуноглобулины (IgA, IgG, IgM), интерлейкины (ИЛ) 1 $\beta$ , 4, 10, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерферон- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), трансформирующий фактор роста-1 $\beta$  (ТФР-1 $\beta$ ), С-реактивный белок (СРБ), тромбоциты и скорость оседания эритроцитов (СОЭ) через 2, 6 и 12 мес от начала терапии МСК.

**Результаты.** Исходный средний ИАБК в 1-й группе составил  $337,6\pm 17,1$  балла, во 2-й –  $332,7\pm 11,0$  балла ( $p=0,3$ ). В обеих группах больных отмечено достоверное снижение ИАБК через 2 мес от начала терапии МСК: в 1-й группе – до  $118,9\pm 12,4$  балла, во 2-й – до  $120,3\pm 14,1$  балла ( $p=0,7$ ), через 6 мес –  $110,3\pm 11,1$  и  $114,3\pm 11,8$  балла ( $p=0,8$ ), соответственно. Через 12 мес ИАБК в 1-й группе составил  $99,9\pm 10,8$  балла, во 2-й –  $100,6\pm 12,1$  балла ( $p=0,8$ ), через 24 мес –  $133,2\pm 28,3$  и  $120,8\pm 15,5$  балла ( $p=0,2$ ), соответственно; через 36 мес –  $139,9\pm 23,4$  и  $141,7\pm 20,8$  балла ( $p=0,9$ ), соответственно. Уровни IgA, IgG, IgM были достоверно ниже в группе больных с более продолжительным анамнезом заболевания и длительно принимающих АЗА. После введения МСК в обеих группах больных БК отмечалась тенденция к росту про- и противовоспалительных цитокинов, с достоверно более низким уровнем провоспалительных цитокинов: ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  – в 1-й группе, свидетельствующим о потенцировании иммуносупрессивного эффекта МСК и АЗА, обеспечивающее более выраженный противовоспалительный эффект.

**Заключение.** Трансплантация МСК способствует повышению в сыворотке крови больных БК изначально сниженной концентрации иммуноглобулинов, цитокинов и восстановлению их баланса по мере наступления клинической ремиссии. Сочетание с АЗА оказывает более выраженный противовоспалительный эффект.

*Ключевые слова:* азатиоприн, болезнь Крона, иммуноглобулины, люминальная форма, клиническая ремиссия, мезенхимальные стромальные клетки, цитокины.

## Mesenchymal stromal cells of bone marrow and azathioprine in Crohn's disease therapy

O.V. KNYAZEV<sup>1</sup>, A.V. KAGRAMANOVA<sup>1</sup>, N.A. FADEEVA<sup>1</sup>, A.A. LISHCHINSKAYA<sup>1</sup>, O.N. BOLDYREVA<sup>1</sup>, K.K. NOSKOVA<sup>1</sup>, R.B. GUDKOVA<sup>1</sup>, A.G. KONOPLYANNIKOV<sup>2</sup>, A.I. PARFENOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S.A. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the "National Research Center of Medical Radiology", Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

Crohn's disease (CD) is a chronic, recurring disease of the gastrointestinal tract of unclear etiology. One of the new approaches to CD therapy is the use of the possibilities of stem cells, in particular, mesenchymal stromal cells (MSCs). Currently, the use of MSC in clinical practice for the treatment of chronic inflammatory and autoimmune diseases is being studied in patients who receive concomitant therapy with other immunomodulatory medications.

**Aim.** To evaluate the effectiveness of MSCs therapy in patients with CD receiving azathioprine (AZA).

**Materials and methods.** The study included 34 patients with inflammatory (luminal) form of CD. The 1<sup>st</sup> group of patients ( $n=15$ ) received anti-inflammatory therapy using MSCs culture in combination with AZA. The 2<sup>nd</sup> group ( $n=19$ ) received MSCs without AZA. The severity of the attack was assessed in points in accordance with the Crohn's disease activity index (CDAI). Immunoglobulins (IgA, IgG, IgM), interleukins (IL) 1 $\beta$ , 4, 10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), transforming growth factor-1 $\beta$  (TGF-1 $\beta$ ), C-reactive protein (CRP), platelets and erythrocyte sedimentation rate (ESR) at 2, 6 and 12 months from the beginning of MSCs therapy.

**Results.** The initial mean CDAI in the 1<sup>st</sup> group was  $337.6\pm 17.1$  points, in the 2<sup>nd</sup> group –  $332.7\pm 11.0$  points ( $p=0.3$ ). In both groups of patients there was a significant decrease in CDAI after 2 months. From the beginning of therapy MSCs: in the 1<sup>st</sup> group to  $118.9\pm 12.4$  points, in the 2<sup>nd</sup> –  $120.3\pm 14.1$  points ( $p=0.7$ ), after 6 months –  $110.3\pm 11.1$  and  $114.3\pm 11.8$  points ( $p=0.8$ ), respectively. After 12 months CDAI in the 1<sup>st</sup> group was  $99.9\pm 10.8$  points, in the 2<sup>nd</sup> group it was  $100.6\pm 12.1$  points ( $p=0.8$ ). The level of IgA, IgG, IgM was significantly lower in the group of patients with a longer history of the disease and long-term ASA. After the introduction of MSC in both groups of patients with BC, there was a tendency for the growth of pro- and anti-inflammatory cytokines, with a significantly lower level of pro-inflammatory cytokines – INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  – in the 1<sup>st</sup> group, indicating potentiation of the immunosuppressive effect of MSCs and AZA, which provides a more pronounced anti-inflammatory effect.

**Conclusion.** Transplantation of MSCs promotes an increase in the serum of patients with CD initially reduced concentration of IG, cytokines and restoring their balance as the onset of clinical remission. The combination with AZA has a more pronounced anti-inflammatory effect.

*Keywords:* azathioprine, Crohn's disease, immunoglobulins, luminal form, clinical remission, mesenchymal stromal cells, cytokines

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

АЗА – азатиоприн

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ГКС – глюкокортикостероиды

ИАБК – индекс активности болезни Крона

ИЛ – интерлейкин

ИНФ- $\gamma$  – интерферон- $\gamma$

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

HLA – антигены главного комплекса гистосовместимости

ПК – плазматические клетки

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ТФР-1 $\beta$  – трансформирующий фактор роста-1 $\beta$

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа

Ig – иммуноглобулин

NK – естественные киллеры

Несмотря на достижения в терапии болезни Крона (БК), около 30% больных нуждаются в проведении альтернативной биологической терапии, примерно 20–40% больных требуется хирургическое вмешательство, которое не гарантирует отсутствия рецидивов. Поэтому остается актуальным дальнейший поиск методов лечения и профилактики рецидивов БК [1].

Одним из новых подходов к терапии БК является использование возможностей стволовых клеток, в частности, мезенхимальных стромальных клеток (МСК) – одной из составляющих «регенеративной медицины» [2]. В последние годы МСК успешно применяют в лечении больных с ревматоидным артритом и воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) [3–6]. Терапевтическая ценность МСК основана на их способности модулировать функции иммунных клеток. При этом важными участниками данного процесса считаются паракринные эффекты, которые осуществляются посредством широкого разнообразия растворимых факторов. Особенно важным является метаболизм триптофана, регулируемый с помощью активности фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и усиления активности регуляторных Т-клеток [7–9]. IDO является цитоплазматическим ферментом, который участвует в катаболическом метаболизме триптофана и известен способностью модулировать иммунную систему и индуцировать иммунологическую толерантность. IDO индуцируется через провоспалительные медиаторы и цитокины, главным образом интерферон- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ). В ответ на ИНФ- $\gamma$  клетки экспрессируют IDO и концентрация триптофана соответственно быстро снижается в окружающей среде наряду с накоплением кинуренина. В результате подобной модуля-

ции метаболизма триптофана происходит ингибирование пролиферации лимфоцитов [7–9].

Кроме иммуномодулирующей способности, МСК обладают низкой иммуногенностью. Это связано с тем, что в нестимулированных МСК экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса очень низкая, а HLA II класса и классические костимулирующие молекулы CD40, CD80 и CD86 не обнаруживаются. Было показано, что стимуляция ИНФ- $\gamma$  увеличивает число молекул обоих классов (I и II), не влияя на экспрессию CD40, CD80 и CD86 [10–14].

Установлено, что иммуномодулирующие препараты, в частности, азатиоприн (АЗА), метотрексат и инфликсимаб, независимо от концентрации, не влияют на жизнеспособность, дифференцировку, фенотип и способность МСК подавлять пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови [15]. По данным H.R. Huang и соавт. [16], инфликсимаб оказывает минимальное воздействие на пролиферацию МСК, апоптоз и их клеточный цикл, в то время как АЗА ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз МСК *in vitro*.

Цель нашей работы – оценить эффективность терапии МСК костного мозга у больных БК, получающих АЗА.

## Материалы и методы

В исследование включены 34 больных с воспалительной (люминальной) формой БК. 1-я группа больных ( $n=15$ ) в возрасте от 19 до 58 лет (Me – 29 лет) получала противовоспалительную терапию с применением культуры МСК в комбинации с АЗА; 2-я группа больных ( $n=19$ ) в возрасте от 23 до 60 лет (Me – 31 год) получала только противовоспалительную терапию и МСК. Особенности сопутствующей противовоспалительной терапии показаны в **табл. 1**.

Культуру МСК в дозе 2 млн/кг вводили трижды в течение месяца с интервалом 1 нед, затем через 6 мес с момента первого введения МСК. АЗА назначали в дозе 2–2,5 мг/кг. Лечение продолжалось от 1 года до 5 лет. Забор, культивирование, хранение и подготовку культуры клеток для введения больным осуществляли в лаборатории отделения клеточной и экспериментальной лучевой терапии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба Минздрава России в соответствии с ранее опубликованной методикой [17].

### Контактная информация:

Парфенов Асфольд Иванович – д.м.н., проф., зав. отд. патологии кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова; тел.: +7(495)304-30-14; e-mail: asfold@mail.ru

### Сведения об авторах:

Князев Олег Владимирович – д.м.н., зав. отд-нием воспалительных заболеваний кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова

Каграманова Анна Валерьевна – к.м.н., с.н.с. отд-ния патологии кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова

Лицинская Альбина Александровна – к.м.н., с.н.с. отд-ния воспалительных заболеваний кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова

Болдырева Оксана Николаевна – к.м.н., м.н.с. отд-ния воспалительных заболеваний кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова

Фадеева Нина Александровна – к.м.н., с.н.с. отд-ния воспалительных заболеваний кишечника МКНЦ им. А.С. Логинова

Коноплянников А.Г. – проф., зав. отд-нием клеточной и экспериментальной лучевой терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба

Носкова К.К. – к.м.н., зав. лаб. МКНЦ им. А.С. Логинова

Гудкова Р.Б. – д.м.н., с.н.с. лаб. научно-диагностических исследований МКНЦ им. А.С. Логинова

Таблица 1. Клинико-демографические и лабораторные показатели больных

Показатели	Группы больных	
	1-я группа: МСК 2 млн/кг + АЗА 2 мг/кг (n=15)	2-я группа: МСК 2 млн/кг без АЗА (n=19)
Пол (м/ж), n (%)	9 (60,0)/6 (40,0)	11 (57,9)/8 (42,1)
Возраст, годы	28,5±2,2 (от 19 до 58; Ме – 29)	31,5±2,8 (от 23 до 60 лет; Ме – 31)
Анамнез болезни, годы	7,0±0,6 (3–12)	4,1±0,8 (3–6)
Исходный ИАБК, баллы	337,6±17	332,7±11,0
Характер течения, n (%):		
хроническое непрерывное	7 (46,6)	9 (47,7)
хроническое рецидивирующее	8 (53,4)	10 (52,3)
Локализация БК, n (%):		
терминальный илеит	4 (26,6)	6 (31,6)
колит	6 (40,0)	6 (31,6)
илеocolит	5 (33,4)	7 (36,8)
Сопутствующая противовоспалительная терапия, n (%):		
препараты 5-АСК	11 (73,3)	13 (68,4)
курсы ГКС	15 (100,0)	19 (100,0)
АЗА	15 (100,0)	0
ГИБП	0	0
Исходные лабораторные показатели:		
IgG, г/л	8,8±0,9	12,5±0,71*
IgM, г/л	0,9±0,01	1,56±0,04*
IgA, г/л	0,6±0,01	2,2±0,08*
тромбоциты, · 10 <sup>9</sup> /л	390,2±35,9	388,6±45,4
СРБ, мг/л	26,5±6,3	25,0±5,8
СОЭ, мм/ч	38,1±5,2	39,6±6,1
ИНФ-γ, пг/мл	110,4±12,5	450,8±22,4*
ФНО-α, пг/мл	13,9±1,9	66,7±14,2*
ИЛ-1β, пг/мл	5,7±0,28	9,2±0,2*
ИЛ-4, пг/мл	10,8±0,5	22,6±2,4*
ИЛ-10, пг/мл	33,1±2,8	42,5±3,1*
ТФР-1β, пг/мл	11,4±1,1	24,6±2,6*

Примечание. 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота, ГКС – глюкокортикостероиды, ГИБП – генно-инженерные биологические препараты. \* $p < 0,05$  – статистические различия между группами

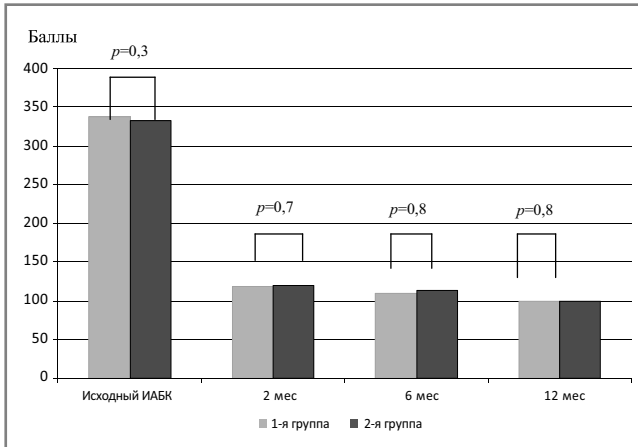
Степень тяжести БК оценивали по индексу активности болезни Крона (ИАБК) Беста в баллах. Сумма <150 баллов соответствовала клинической ремиссии, 150–300 баллов – легкой степени, 301–450 баллов – средней степени, >450 баллов – тяжелой степени. У всех больных, включенных в исследование, индекс Беста соответствовал средней степени тяжести БК. У больных 1-й группы он в среднем составлял 337,6±17,1 балла, у больных 2-й группы – 332,7±11,0 балла ( $p=0,3$ ). Эффективность терапии оценивали через 2, 6 и 12 мес по данным расчета ИАБК, уровня иммуноглобулинов классов А, G и М (IgA, IgG, IgM), интерлейкинов (ИЛ) – ИЛ-1β, ИЛ-4, ИЛ-10, фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), ИНФ-γ, трансформирующего фактора роста-1β (ТФР-1β), С-реактивного белка (СРБ), тромбоцитов и скорости оседания эритроцитов (СОЭ) через 2, 6 и 12 мес. Иммуноглобулины в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии. ИЛ-1β, ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-4, ИЛ-10 и ТФР-1β исследовали иммуноферментным твердофазным методом с помощью тест-систем ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург), Orgentec (Германия), «Евроиммун», «Ведалаб» (Франция). Статистический анализ выполняли с использованием пакета прикладных программ Microsoft® Office Excel 2003; Statistica v. 6,0; Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz

1998. Для определения значимости различий между средними величинами при нормальном распределении совокупностей применялся t-критерий Стьюдента. При определении рисков рецидива БК по методике «заболеваемость» учитывали новые случаи исходов (рецидивов), возникших за время наблюдения в обеих группах больных.

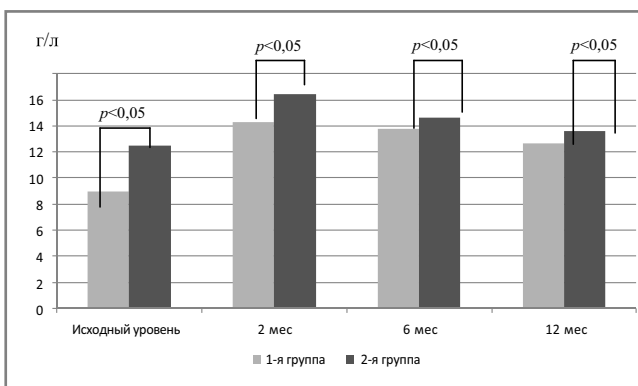
«Протокол ограниченных клинических испытаний метода системной трансплантации аллогенных МСК костного мозга человека у больных язвенным колитом и БК» утвержден ученым советом и согласован с локальным этическим комитетом МКНЦ им А.С. Логинова. Данное исследование проведено до вступления в силу Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Пациенты подписывали письменное информированное согласие на участие в настоящем исследовании. Клинические, демографические характеристики больных БК, а также исходные лабораторные показатели представлены в табл. 1.

## Результаты и обсуждение

Через 2 мес у всех пациентов 1-й и 2-й групп достигнута клиническая ремиссия: частота стула не превышала 4 раз в сутки; стул оформленный, без патологических при-



**Рис. 1.** Динамика ИАБК в группах больных за 12 мес наблюдения.

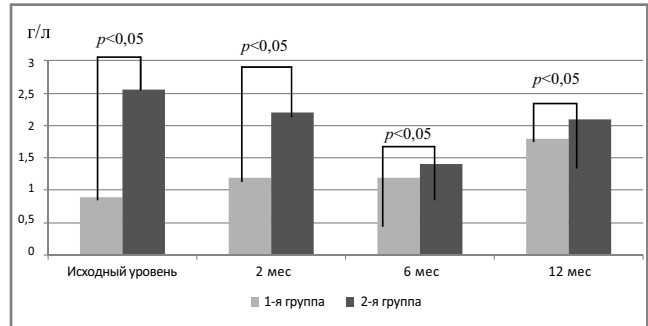


**Рис. 2.** Динамика уровня IgG после введения МСК в обеих группах.

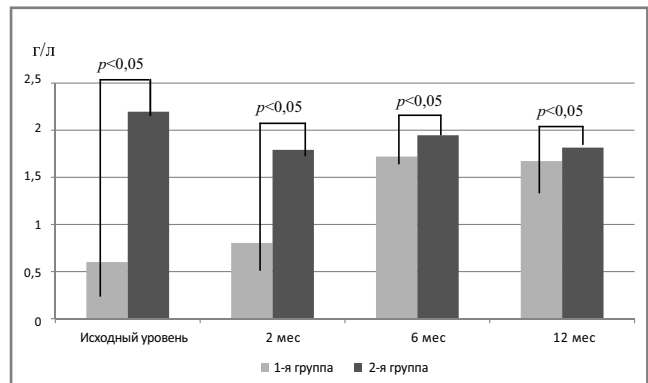
месей; отсутствовали боли в животе. Отмечалась прибавка массы тела. Через 6 мес у 4 (26,7%) больных 1-й группы и у 6 (31,6%) больных 2-й группы наступила клинко-эндоскопическая ремиссия ( $p_{1,2} > 0,05$ ). Через 12 мес у 1 (6,6%) больного 1-й группы и у 2 (10,5%) больных 2-й группы развился рецидив БК [относительный риск – 0,63, 95% доверительный интервал 0,06–6,34,  $p=0,82$ ], который проявился увеличением частоты стула, болями в животе, ухудшением общего самочувствия, наличием лихорадки выше 38,5 °С. Больным назначены ГКС в дозе 1 мг/кг. На **рис. 1** показана динамика ИАБК в группах больных за 12 мес наблюдения.

В обеих группах больных отмечено достоверное снижение ИАБК. Через 2 мес он составил в 1-й группе 118,9±12,4 балла, во 2-й – 120,3±14,1 балла ( $p=0,7$ ). Через 6 мес этот показатель снизился до 110,3±11,1 и 114,3±11,8 балла, соответственно ( $p=0,8$ ); через 12 мес – до 99,9±10,8 и 100,6±12,1 балла, соответственно ( $p=0,8$ ).

Вопрос о влиянии МСК на функциональное состояние иммунной системы больных ВЗК в настоящее время практически не исследован, поэтому полученные нами сравнительные данные об изменениях иммунного статуса больных БК под влиянием лечения МСК как в комбинации с АЗА, так и без него, представляют интерес. Известно, что длительное применение иммунодепрессантов (ГКС, цитостатиков) при прогрессирующем течении БК сопровождается угнетением функциональной активности иммунной системы, снижением уровня цитокинов и иммуноглобулинов [18]. Действительно, как показывают наши данные, уровень IgA, IgG, IgM достоверно ниже у больных 1-й



**Рис. 3.** Динамика уровня IgM после введения МСК в обеих группах.



**Рис. 4.** Динамика уровня IgA после введения МСК в обеих группах.

группы, отличавшихся более продолжительным анамнезом и длительным применением АЗА (см. табл. 1).

После повторной трансплантации МСК содержание иммуноглобулинов становилось достоверно более высоким (**рис. 2–4**).

Так, уровень IgG в сыворотке крови у больных 1-й группы через 2, 6 и 12 мес составлял 14,3±0,8, 13,8±0,6 и 12,7±0,7 г/л, соответственно; содержание IgM – 1,2±0,2, 1,2±0,2 и 1,8±0,1 г/л, соответственно; IgA – 0,8±0,02, 1,72±0,1 и 1,67±0,7 г/л, соответственно, что было достоверно выше по сравнению с исходным уровнем иммуноглобулинов в обеих группах больных БК ( $p < 0,05$ ).

Известно, что МСК осуществляют супрессию В-звена иммунной системы опосредованно через Т-звенно. При совместном культивировании МСК подавляют продукцию иммуноглобулинов плазматическими клетками (ПК), не нарушая при этом их пролиферацию. В основе механизма такого действия МСК лежит блокировка сигнального пути STAT-3, отвечающего за дифференцировку В-клеток в ПК. Таким образом, ПК переводятся на более низкую стадию дифференцировки с подавлением продукции иммуноглобулинов [19]. Однако МСК могут модулировать иммунный ответ, который, как известно, играет ключевую роль в патогенезе БК. Показано, что человеческие МСК ингибируют пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови и продукцию ИНФ-γ, в то время как секреция противовоспалительных ИЛ усиливается. На мышинной модели колита, индуцированного тринитробензолсульфоновой кислотой, показано, что человеческие МСК улучшают клинические и микроскопические проявления колита, уменьшают системную и локальную продукцию провоспалительных цитокинов, связанную со слизистой оболочкой кишечника, увеличивают секрецию противовоспалительных цитокинов и индуцируют регуляторные Т-клетки в

**Таблица 2.** Динамика лабораторных показателей активности воспалительного процесса, про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови после трансплантации МСК (М±σ)

Показатели	Время наблюдения					
	2 мес		6 мес		12 мес	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Тромбоциты, ·10 <sup>9</sup> /л	300,2±21,4	288,6±16,7	320,4±25,3	318,2±25,8	303,9±20,9	308,7±19,6
СРБ, мг/л	9,7±1,5	8,9±1,8	6,5±1,3	7,0±2,1	8,1±1,3	10,9±2,8
СОЭ, мм/ч	18,2±2,2	17,9±1,9	15,6±2,8	19,3±3,6	17,1±3,8	19,6±4,1
ИНФ-γ, пг/мл	86,5±9,1	96,9±12,1	79,4±8,5	80,8±7,3	90,8±6,5	128,8±12,3*
ФНО-α, пг/мл	39,6±8,4	56,5±10,7	44,9±6,3	49,7±10,4	78,9±10,5	116,9±13,2*
ИЛ-1β, пг/мл	50,7±9,3	56,2±10,2	45,6±7,3	54,2±9,2	68,7±8,9	96,9±9,6*
ТФР-1β, пг/мл	110,4±18,1	104,6±20,8	121,9±19,4	124,6±20,2	60,4±5,3	56,6±6,2
ИЛ-4, пг/мл	74,8±11,6	82,6±12,8	103,8±12,5	122,6±20,8	80,6±11,5	82,6±12,4
ИЛ-10, пг/мл	93,1±25,7	89,5±18,1	146,5±29,6	142,8±30,3	109,1±22,3	112,5±23,4

Примечание. \* $p < 0,05$  между группами

брыжеечных лимфатических узлах мышей с экспериментальным колитом [20]. Поэтому МСК проявляют себя как мощные прямые модуляторы иммунной системы, нормализующие уровень иммуноглобулинов.

Полученные нами результаты подтверждают иммуномодулирующий эффект МСК, направленный на стимуляцию угнетенной иммунной системы больных БК, длительно получающих иммуносупрессоры, и последующий противовоспалительный эффект.

Через 2 мес уровень IgA и IgM в 1-й группе был ниже, чем у пациентов 2-й группы, что также свидетельствует о более значимом угнетении иммунной системы пациентов с БК, длительно получающих иммуносупрессоры. Через 6 и 12 мес в обеих группах уровни IgA, IgM и IgG были сопоставимы и находились в пределах референсных значений.

Аналогично изменялся и уровень про- и противовоспалительных цитокинов сыворотки крови, которые также зависят от продолжительности БК и длительности приема иммуносупрессоров. Необходимо подчеркнуть, что у подавляющего большинства больных БК, длительно принимающих иммуносупрессоры, в исходном состоянии, предшествующем трансплантации МСК, при наличии выраженных клинических, эндоскопических и гистологических проявлений содержание цитокинов и иммуноглобулинов в сыворотке крови снижено. Это обусловлено тяжелым прогрессирующим течением аутоиммунного заболевания, длительным применением иммуносупрессивной терапии, угнетением функциональной активности иммунной системы, развитием вторичного иммунодефицита. По мере увеличения продолжительности БК и частоты рецидивов концентрация циркулирующих цитокинов уменьшалась, что можно расценить как результат истощения и угнетения продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками [21]. В нашем исследовании исходный уровень ИЛ-1β, ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-12, ИЛ-4 и ТФР-1β был достоверно ниже в группе больных с более продолжительным анамнезом заболевания и длительно принимающих АЗА (см. табл. 1).

В табл. 2 показана динамика лабораторных показателей активности воспалительного процесса, про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови после трансплантации МСК.

Через 2 мес после введения МСК отмечен достоверный рост уровней ИНФ-γ, ФНО-α, ИЛ-1β в обеих группах, причем уровень ФНО-α был достоверно ниже в 1-й группе больных, что, вероятно, связано с дополнительным противовоспалительным эффектом АЗА. Исходя из этого, можно предположить, что МСК и АЗА потенцируют иммуносупрессивный эффект друг друга. В обеих группах больных БК отмечался значительный достоверный рост противовоспалительных цитокинов: ТФР-1β, ИЛ-10, – что обусловлено продукцией МСК противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов (ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-14, колониестимулирующих факторов). Динамика уровней про- и противовоспалительных цитокинов после введения МСК свидетельствует об иммунорегуляторных свойствах МСК костного мозга.

Через 6 мес после введения МСК в обеих группах больных БК отмечена тенденция к росту про- и противовоспалительных цитокинов, обеспечивающая баланс между ними. Через 12 мес отмечалось достоверно более низкое снижение уровня провоспалительных цитокинов: ИНФ-γ, ФНО-α, ИЛ-1β – в 1-й группе, свидетельствующее о потенцировании иммуносупрессивного эффекта МСК и АЗА, обеспечивающего более выраженный противовоспалительный эффект. Уровень противовоспалительных цитокинов: ТФР-1β, ИЛ-4, ИЛ-10 – в обеих группах сопоставимы и находились в реципрокной зависимости с провоспалительными цитокинами.

Таким образом, трансплантация МСК сопровождается разнонаправленными изменениями иммунного статуса больных, а именно – повышением в сыворотке крови изначально сниженной концентрации цитокинов, иммуноглобулинов, восстановлением баланса про- и противовоспалительных цитокинов, что коррелирует с положительной клинической динамикой БК.

АЗА, возможно, потенцирует иммуносупрессивное действие МСК и усиливает их терапевтические свойства, тогда как МСК в свою очередь могут изменять иммуносупрессивную способность АЗА. Клиническая активность БК и частота рецидивов не зависят от монотерапии МСК или их комбинации с АЗА. Однако у больных БК, получающих одновременно АЗА и МСК, уровень провоспалительных

тельных цитокинов достоверно ниже, чем у пациентов, получавших только МСК. При более длительном наблюдении это может стать фактором, способным уменьшить активность воспалительного процесса и частоту рецидивов БК.

## Заключение

Дополнение терапии МСК иммуносупрессором АЗА оказывает более выраженный противовоспалительный терапевтический эффект. Основные функциональные свой-

ства МСК, являющиеся терапевтически значимыми для контроля воспаления, не нарушаются в результате взаимодействия с АЗА. МСК могут восстанавливать баланс нарушенной иммунной системы у больных БК, связанный с прогрессированием заболевания и длительным приемом иммуносупрессоров.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Парфенов А.И. Болезнь Крона: к 80-летию описания. *Терапевтический архив*. 2013;85(8):35-42 [Parfenov AI. Crohn's disease: to the 80th anniversary of the description. *Terapevticheskii Arhiv = Therapeutic Archive*. 2013;85(8):35-42 (In Russ.)].
2. Nelson TJ, Behfar A, Terzic A. Strategies for Therapeutic Repair: The "R3" Regenerative Medicine Paradigm. *Clin Transl Sci*. 2008 Sept 10;1(2):168-71.
3. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010;59:1662-9.
4. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011;60:788-98.
5. De la Portilla F, Alba F, Garcia-Olmo D, et al. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28:313-23.
6. Князев О.В., Парфенов А.И., Щербаков П.Л., Хомерики С.Г., Ручкина И.Н., Конопляников А.Г. Эффективность и безопасность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у больных с рефрактерными формами болезни Крона. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013;VIII(1):76-84 [Knyazev OV, Parfenov AI, Shcherbakov PL, Khomeriki SG, Ruchkina IN, Konoplyanikov AG. Efficacy and safety of mesenchymal bone marrow stromal cells in patients with refractory forms of Crohn's disease. *Kletochnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya = Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2013;VIII(1):76-84 (In Russ.)].
7. Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103:4619-21.
8. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2795-806.
9. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90:516-25.
10. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890-6.
11. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003;10:228-41.
12. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006;24:1246-53.
13. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-49.
14. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, et al. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunol Cell Biol*. 2013; 91:40-51.
15. Duijvestein M, Molendijk I, Roelofs H, et al. Mesenchymal stromal cell function is not affected by drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytotherapy*. 2011;13:1066-73.
16. Huang HR, Zan H, Lin Y, Zhong YQ. Effects of azathioprine and infliximab on mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of rats in vitro. *Mol Med Rep*. 2014 Mar;9(3):1005-12. doi: 10.3892/mmr.2014.1905. Epub 2014 Jan 17.
17. 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):71-6 [Tsyb AF, Konoplyanikov AG, Kolesnikova AI, Pavlov VV. Reception and use in medicine of cell cultures from mesenchymal stem cells of human bone marrow. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2004; 59(9):71-6 (In Russ.)].
18. Долгих В.Т. Основы иммунопатологии. Ростов-на-Дону: Феникс; 2007. С. 119-58 [Dolgikh VT. *Osnovy immunopatologii* [Fundamentals of immunopathology]. Rostov-on-Don: Phoenix; 2007. P. 119-58 (In Russ.)].
19. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, et al. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*. 2008;112:4991-8.
20. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Rico L, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009;58:929-39.
21. Царегородцева Т.М., Серова Т.И. Цитокины в гастроэнтерологии. Москва: Анахарсис; 2003. 96 с. [Tsaregorodtseva TM, Serova TI. *Tsitokiny v gastroenterologii* [Cytokines in gastroenterology]. Moscow: Anaharsis; 2003. 96 p. (In Russ.)].

Поступила 11.08.17