

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ КРОНА, У КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ЯКИХ ЗАСТОСОВУВАЛИ ЕМБРІОНАЛЬНІ КЛІТИННІ СУСПЕНЗІЇ, ЩО МІСТЯТЬ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ГЕМОПОЕЗУ

В.О. Бушнєва

Національний медичний університет ім. акад. О.О.Богомольця, Київ

Резюме

У статті викладено дані досліджень щодо змін умісту субпопуляцій лімфоцитів у периферійній крові 15 пацієнтів з хворобою Крона (ХК), у комплексному лікуванні яких застосовувались ембріональні клітинні суспензії (ЕКС), що містять стовбурові гемопоетичні клітини. Імунологічний статус оцінювався за допомогою непрямого імунофлюоресцентного тесту з панелями моноклональних антитіл серії Ley (Becton Dickinson, США), що виявляють поверхневі антигени кластерів CD3, CD4, CD8, CD22. Застосування ЕКС у комплексному лікуванні хворих ХК дозволяє досягти зниження активності запального процесу та входження в ремісію тих пацієнтів, у яких базисна консервативна терапія виявилася неефективною та продовжує термін ремісії.

Ключові слова: лімфоцити, гемопоетичні клітини, хвороба Крона.

Хвороба Крона (ХК) входить до групи неспецифічних запальних захворювань кишечника (НЗЗК). Провідне місце в патогенезі ХК займають порушення імунітету, що підтверджується наступними даними: наявність аутоантитіл до кишкових клітин; наявність позакишкових проявів; ефективність препаратів-імуносупресорів у лікуванні. Вважається, що ХК розвивається в результаті гіперактивації специфічного імунітету на тлі генетичної схильності організму під впливом провокуючих екзо- та ендогенних чинників, таких як вірусна або бактеріальна інфекція, неправильне харчування, несприятливі чинники навколишнього середовища, стрес. Провокуючий чинник запускає каскад реакцій, а саме: екстравазацію клітин-медіаторів запалення з системного кровообігу, міграцію їх у слизову та підслизову оболонку та подальшу продукцію ними неспецифічних медіаторів запалення, таких як тромбосани, лейкотрієни, простагландини та вільні радикали.

Більшість досліджень, пов'язаних із вивченням імунних порушень під час ХК, присвячено змінам в імунній системі слизової оболонки кишечника. Лише невелика кількість даних, зокрема, повідомлення Slotwinski R. та співавт., описують зміни вмісту субпопуляцій лімфоцитів у периферійній крові. Так, досліджуючи вираженість поверхневих антигенів лімфоцитів периферійної крові у хворих ХК, було виявлено тенденцію до зниження відсоткового вмісту CD8+, а відношення CD4+/CD8+ було вірогідно знижене. У пацієнтів з НЗЗК, яким було проведено хірургічне лікування, відсотковий уміст CD8+ був вірогідно знижений [2].

У даній роботі ми подаємо власні дослідження змін клітинного імунітету у хворих ХК, у комплексному лікуванні яких застосовувались ембріональні клітинні суспензії (ЕКС), що містять стовбурові гемопоетичні клітини [3]. Метою дослідження стало покращання результатів лікування ХК шляхом застосування ембріональних клітинних суспензій, що містять гемопоетичні стовбурові клітини печінки людини.

Ми використовували кріоконсервовані гемопоетичні клітини, виготовлені з печінки та селезінки ембріона людини гестаційного віку 6–12 тиж. Суспензії містили $0,5 \times 10^8$ – $2,5 \times 10^8$ ядровмісних клітин в 1 мл, об'єм уведеної суспензії 1–4 мл, шлях введення — внутрішньовенний крапельний на 200 мл фізіологічного розчину. Побічних явищ під час введення відмічено не було.

З метою безпечності введення, ембріональний матеріал проходив бактеріологічне та вірусологічне дослідження, а також проводилася фетальна діагностика інфекцій, які можуть передаватися ембріону від матері (дослідження на ВІЛ-інфекцію, вірусні гепатити В та С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси краснухи та герпесу).

Вважається, що після введення клітин в організм реципієнта вони розподіляються, залишаючись в місцях кровотворного мікрооточення, розмножуються та диференціюються. У процесі поділу введені клітини виділяють велику кількість біологічно активних речовин, таких як інтерлейкіни, інтерферони, гемопоетичні фактори росту, фактори росту судин, нервів і тощо. Ембріональні клітини також мають трофічний вплив на організм [1].

Трансплантації ЕКС використовувалися в комплексному лікуванні хворих ХК за наступними показаннями: 1) випадки прогресуючого перебігу захворювання в разі неефективності консервативної терапії протягом 2 тиж лікування в стаціонарі; 2) наявність позакишкових ускладнень; 3) неможливість хірургічного лікування внаслідок важкого стану пацієнта, що зумовлений анемією, гіпопротеїнемією, глибокими метаболічними порушеннями; 4) кахексія; 5) труднощі у доборі однокрупної крові для гемотрансфузій або несумісність однокрупної крові донора та реципієнта, яка виявляється в пробах на сумісність. Протипоказами для застосування ЕКС були: 1) васкуліти у фазі загострення; 2) гострі тромбози; 3) свіжі крововиливи в середовища ока; (в усіх перерахованих випадках

лікування можливо не раніше, ніж через 3 міс); 4) виражена гіпертензія малого кола кровообігу, 5) вогнища хронічної інфекції (необхідність попередньої санації).

Матеріали та методи

Для порівняльної оцінки ефективності застосування ембріональних клітинних суспензій у комплексному лікуванні пацієнтів з ХК було проаналізовано дві групи хворих: I — група з 15 пацієнтів, у комплексному лікуванні яких використовувалися ЕКС (досліджувана група); II — група з 11 пацієнтів, пролікованих без застосування ЕКС (контрольна).

За основними параметрами захворювання (ступінь важкості, локалізація, тривалість захворювання, наявність позакишкових проявів, вік, стать) досліджувана та контрольна групи не відрізнялися між собою. В обох клінічних групах більшу частину склали пацієнти з середнім ступенем важкості перебігу патологічного процесу. Кожному з хворих було виконано від 1 до 3 трансплантації, у середньому $1,93 \pm 0,26$. Повторні трансплантації проводилися в термін від 20 дів до 3 років після першої, у середньому через $8,9 \pm 0,6$. Показанням для проведення повторних трансплантацій були такі самі, як і для первинних.

Комплексна консервативна терапія включала дієтотерапію, застосування салазопохідних сульфамілідів в терапевтичних дозах: 2–4 г салофальку або 4–6 г сульфосалазину; метронідазол 1,5 г на добу, ферментні препарати (фестал, мезим), антигістамінні препарати, пробіотики (біфікол, лактобактерин). З метою корекції метаболічних розладів проводилась інфузійна терапія глюкозо-сольовими розчинами, амінокислотними сумішами.

Імунологічний статус пацієнтів оцінювали за допомогою непрямого імунофлуоресцентного тесту з панелями моноклональних антитіл серії Ley (Becton Dickinson, США), що виявляють поверхневі антигени кластерів CD3, CD4, CD8, CD22. Дослідження проводили на лазерному проточному цитофлуорометрі Facstar Plus (Becton Dickinson, США), обладнанням комп'ютером HP-310 за допомогою лазера "Іннова" 200 мВт. Термін спостереження за хворими — 1 рік.

На момент проведення першої трансплантації всі хворі досліджуваної та контрольної групи знаходились у фазі загострення захворювання та скаржилися на підвищення частоти стулу, зміну його консистенції до кашкоподібної або рідкої, домішки слизу та/або крові в калі, біль у животі, тенезми, підвищення температури тіла; 4 хворих досліджуваної та 1 хворий контрольної групи скаржилися на біль у суглобах.

Результати та їх обговорення

Клінічна ремісія протягом 1 міс лікування була досягнута в $(50 \pm 14,43)\%$ випадків в досліджуваній та в $(45,45 \pm 15,01)\%$ випадків у контрольній групі. Хірургічне лікування протягом цього періоду було проведено у $(26,67 \pm 11,42)\%$ хворих досліджуваної та у $(27,27 \pm 13,42)\%$ хворих контрольної групи. Тривалість клінічної ремісії серед пацієнтів, яким за період спостереження не проводилось оперативне лікування, склала в досліджуваній групі $28,3 \pm 2,67$ міс, у контрольній — $12,5 \pm 1,26$ міс ($p < 0,05$). Наведені дані

свідчать про позитивний вплив ЕКС на клінічний перебіг захворювання.

Під час аналізу динаміки імунологічних показників у досліджуваній групі хворих до початку лікування відмічено зниження, порівняно зі здоровими людьми, абсолютного та відносного вмісту CD3+, CD4+ та CD8+ лімфоцитів, абсолютного вмісту CD16-NK+ та абсолютного вмісту лімфоцитів ($p < 0,05$) у досліджуваній групі. У контрольній групі, окрім змін перелічених показників, вірогідно знижений відносний уміст CD16-NK+, у той час як зниження абсолютного вмісту лімфоцитів не є вірогідним. Імунорегуляторний індекс CD4+/CD8+ у досліджуваній групі був підвищений на 9%, порівняно зі здоровими, у контрольній — на 7%.

Через 8–15 дів після трансплантації в досліджуваній групі, порівняно з рівнем до трансплантації, вірогідно знизився абсолютний та відносний уміст CD19+, CD3+, CD4+ та абсолютний уміст CD8+ лімфоцитів. У цей термін у контрольній групі не було відмічено вірогідних змін показників.

У термін спостереження 30–60 дів у досліджуваній групі відмічається вірогідне зниження абсолютного вмісту CD19+ та відносного вмісту CD3+ та CD4+ лімфоцитів, порівняно з рівнем до трансплантації. У контрольній групі відмічено статистично вірогідне зниження абсолютного вмісту CD8+ лімфоцитів.

У термін спостереження 90–120 дів у досліджуваній групі спостерігається статистично вірогідне зниження абсолютного вмісту CD19+ та відносного вмісту CD3+ і CD4+ лімфоцитів, порівняно з рівнем до трансплантації. У контрольній групі не було відмічено вірогідних змін показників.

Наприкінці терміну спостереження в досліджуваній групі показники вірогідно не відрізняються від рівня перед трансплантацією. Абсолютний уміст CD8+ лімфоцитів був вірогідно вищим, ніж у контрольній групі. Динаміка імунологічних показників досліджуваної групи викладена в табл. 1.

Як впливає з наведених даних, у досліджуваній групі хворих ХК на 8–15 добу після трансплантації спостерігалось статистично вірогідне зниження показників клітинного імунітету, порівняно з рівнем до трансплантації, яке ми пов'яжемо з впливом уведених ЕКС. У контрольній групі подібних змін відмічено не було. Пізніше спостерігалось поступове підвищення імунологічних показників і під кінець періоду спостереження не було відмічено статистично вірогідних змін, порівняно з рівнем перед трансплантацією. Абсолютний уміст CD8+ лімфоцитів у досліджуваній групі був вірогідно вищим, ніж у контрольній.

Таким чином, у процесі лікування було досягнуто:

1. Зниження активності запального процесу та входження в ремісію тих пацієнтів, у яких базисна консервативна терапія виявилася неефективною.
2. Можливості знизити дози глюкокортикоїдів або припинити їх прийом, зберігаючи ремісію.
3. Продовження терміну ремісію.

Отже, наші спостереження можуть свідчити про позитивний вплив ЕКС, що містять стовбурові клітини гемопоєзу, на клінічний перебіг та імунологічні показники пацієнтів з ХК.

Таблиця 1

Динаміка показників клітинного імунітету в досліджуваній групі пацієнтів з ХК

| Показник | n | Лімф. абс., Г/л | CD3+ | | CD4+ | | CD8+ | | CD4+/CD8+ | CD19+ | | CD16+ -NK | | |
|-------------------|----|-----------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | | Г/л | % | Г/л | % | Г/л | % | | Г/л | % | Г/л | % | |
| Здорові | 20 | M | 2,06 | 1,34 | 60,94 | 0,86 | 38,55 | 0,52 | 23,89 | 1,63 | 0,21 | 8,84 | 0,39 | 18,96 |
| | | m | 0,21 | 0,02 | 1,49 | 0,01 | 0,84 | 0,01 | 2,01 | 0,04 | 0,08 | 1,44 | 0,01 | 4,43 |
| До трансплантації | 14 | M | 1,35 | 0,57* | 43,94* | 0,36* | 26,41* | 0,19* | 15,12* | 1,78 | 0,12 | 10,1 | 0,19* | 15,58 |
| | | m | 0,22 | 0,08 | 2,92 | 0,06 | 1,95 | 0,02 | 1,07 | 0,16 | 0,01 | 1,64 | 0,04 | 4,01 |
| 8-15 | 9 | M | 1,01* | 0,25* | 31,05* | 0,2* | 20,26* | 0,13* | 11,95* | 1,72 | 0,06* | 5,9* | 0,13* | 8,8* |
| | | m | 0,15 | 0,05 | 3,35 | 0,04 | 1,69 | 0,02 | 1,6 | 0,11 | 0,01 | 0,68 | 0,03 | 1,25 |
| 30-60 | 14 | M | 1,28*^ | 0,41* | 32,11* | 0,26* | 20,7* | 0,15* | 12,4* | 1,84 | 0,08* | 6,86 | 0,16* | 12,8 |
| | | m | 0,17 | 0,06 | 3,22 | 0,04 | 2,08 | 0,03 | 1,63 | 0,21 | 0,01 | 0,69 | 0,02 | 1,59 |
| 90-120 | 10 | M | 1,44*^ | 0,45* | 31,92* | 0,28* | 19,91* | 0,17* | 12,06* | 1,66 | 0,09* | 6,56 | 0,21* | 14,35 |
| | | m | 0,22 | 0,08 | 3,71 | 0,05 | 2,23 | 0,03 | 1,45 | 0,09 | 0,01 | 0,82 | 0,05 | 3,61 |
| 180-360 | 7 | M | 1,36*^ | 0,43* | 35,08* | 0,28* | 22,69* | 0,2* | 15,02*^ | 1,96 | 0,13 | 12,11 | 0,17* | 15,17 |
| | | m | 0,29 | 0,06 | 4,57 | 0,04 | 4,08 | 0,02 | 3,85 | 0,15 | 0,02 | 2,87 | 0,02 | 2,99 |

Примітка: * — $p < 0,05$, порівняно з рівнем до трансплантації; ■ — $p_1 < 0,05$, порівняно з показниками здорових людей; ^ — $p_2 < 0,05$, порівняно з контрольною групою.

Література

- [1] Смикодуб О.І. Клітинна терапія — новий напрямок в клініці внутрішніх хвороб/ Матеріали 14-го з'їзду терапевтів України. — К., 1998. — С.586–588.
 [2] Смикодуб А.И., Бушнева В.А. Иммунологические нарушения при неспецифических воспалительных заболеваниях кишечника//Иммунология и аллергология.

— 2000. — №4. — С.28–33.

- [3] Smikodoub A., Bushneva V. Treatment of Patients Suffering from Autoimmune Intestinal Diseases with the Use of Fetal Cell Suspensions//Cell Transplantation. — 1999. — V.8. — N 2. — P.200.

Резюме

В статье приводятся данные собственных исследований изменения содержания субпопуляций лимфоцитов в периферической крови 15 пациентов с болезнью Крона (БК), в комплексном лечении которых использовались эмбриональные клеточные суспензии (ЭКС), содержащие стволовые клетки гемопоэза. Иммунологический статус пациентов оценивали при помощи непрямого иммунофлюоресцентного теста с панелями моноклональных антител серии Ley (Becton Dickinson, США), выявляющих поверхностные антигены кластеров CD3, CD4, CD8, CD22. Применение ЭКС в комплексном лечении больных с БК позволяет достигнуть снижения активности воспалительного процесса и вхождения в ремиссию тех пациентов, у которых базисная консервативная терапия оказалась неэффективной и ведет к удлинению ремиссии.

Summary

The article shows the own research data on cell immunity in 15 patients with Crohn's disease. Patients were treated in complex on the bases of embrionic cell suspensions (ECS) containing hematopoietic stem cells. Assesed was the immunological status of patients by indirect immunofluorescent testing with Ley series of monoclonal antibody panels (Becton Dickinson, USA) to expose surfase antigens to CD3, CD4, CD8, CD22 clusters. ECS application in complex treatment of patients with Crohn's disease allowed for the inflammatory reduction and remission in patients with whom the conservative therapy proved to be ineffective and increased the period of remission.