

М. П. ДЕМЧУК, О. І. СМІКОДУБ (Київ)

**АНЕМІЧНИЙ СИНДРОМ ПРИ РЕВМАТОЇДНОМУ АРТРИТІ
ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ ГЕМОПОЕТИЧНИХ
СЛОВБУРОВИХ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ**Клініка клітинної терапії Національного медичного університету
та Центру ембріональних тканин "EmCell"

Ревматоїдний артрит (РА) — хронічне системне імунне запальне захворювання, яке характеризується симетричним ураженням суглобів. При РА спочатку уражується синовіальна оболонка суглоба, в якій відбуваються запальні процеси. Синовіальні клітини активно проліферують, утворюючи агресивну грануляційну тканину — панус, який в процесі росту руйнує кісткову, хрящову тканини та зв'язки, що призводить до деструкції й деформації суглоба [4].

В основі РА і його системних проявів лежать імунopatологічні механізми [2], які діють на рівні судин мікроциркуляції та сполучнотканинних міжсудинних проміжків. Вивчені різні аспекти ураження мікроциркуляторного русла при РА: в'язкість крові та плазми, агрегаційна активність формених елементів крові, стан гемостазу. При РА розвивається синдром підвищеної в'язкості крові, для якого характерні головний біль, порушення зору, носова і/або маткова кровотеча, схуднення, гарячка, нефропатія та ін. В патогенезі синдрому підвищеної в'язкості крові провідну роль відіграють крупнодисперсні білки, а саме імуноглобуліни та імунні комплекси. Інтенсивне відкладення імунних комплексів, імуноглобулінів, комплекменту в стінці судин призводить до підсилення адгезії формених елементів з виділенням медіаторів запалення, які посилюють мікроциркуляторні порушення. Показники в'язкості крові тісно пов'язані з активністю РА. При збільшенні активності РА зростає в'язкість крові.

При РА відмічається зв'язок між синдромом дисемінованого внутрішньосудинного зсідання [2] та анемією. Анемія може бути нормо- або гіпохромною з помірним зменшенням кількості еритроцитів. Рівень гемоглобіну зменшується здебільшого не нижче 90 г/л і лише при дуже тяжких формах досягає 35–40 г/л. Анемія чітко корелює з активністю патологічного процесу при РА.

У хворих на РА знижені всі сироваткові показники обміну заліза, пов'язані з активністю запального процесу в суглобах [8]. Зв'язок недокрів'я з порушенням обміну заліза та синтезу гемоглобіну ґрунтується на тому, що остання стадія синтезу гемоглобіну — це включення заліза в молекулу протопорфірину. При РА виявлено знижену концентрацію сидерофіліну — білка, який транспортує залізо, що різко утрудняє доставку заліза до кісткового мозку. В ретикулярних клітинах кісткового мозку, печінки та селезінки виявляється значний надлишок заліза.

Блокада заліза в ретикуло-ендотеліальній системі (РЕС) внутрішніх органів — одна з патогенетичних ланок недокрів'я при РА. Затримка заліза в РЕС залежить, з одного боку, від підвищення його фагоцитарної активності, з другого — від утруднення транспорту заліза кров'ю.

При РА гемоліз еритроцитів виражений слабо [3]. Його причиною може бути підсилення вільнорадикального окислення ліпідів, яке має місце при РА. Гемоліз відіграє допоміжну роль у виникненні анемії. Анемія розвивається на початку захворювання, що зумовлено зниженням потреби в залізі внаслідок пригнічення еритропоезу. Анемія при РА має гіпорегенераторний характер. Про гіпорегенерацію еритропоезу свідчить відсутність збільшення кількості ретикулоцитів відповідно до зниженого рівня гемоглобіну та величини гемолізу.

При дослідженні хворих на РА з анемією виявлено зниження проліферативної активності еритроїдних клітин кісткового мозку, затримку дозрівання цих клітин на більш зрілих стадіях розвитку. Зниження регенераційного потенціалу термінального відділу еритропоезу викликають плазмові інгібітори — низькомолекулярні пептиди, які є одним з механізмів формування анемії [2]. В інгібуванні еритропоезу певну роль відіграють макрофаги та цитокіни. При відсутності "прилипаючих" клітин (макрофагів) збільшується

ріст еритроїдних бурст та колоній. Пригнічувальний ефект макрофагів зумовлений продуктом невідомої природи, який вони виробляють. При видаленні макрофагів (шляхом прилипання) із здорового кісткового мозку підсилюється ріст еритроїдних колоній.

Фактор некрозу пухлини (ФНП) виявляє інгібуєчий вплив на ранні еритроїдні попередники і менше — на пізні. ФНП належить до основних інгібіторів еритропоезу при анемії, яка супроводжує хронічні захворювання. У плазмі хворих на РА спостерігається підвищений рівень ФНП [2].

У плазмі хворих на РА рівень інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) постійно підвищений і корелює з активністю, в тому числі й з анемією. ІЛ-1 інгібує еритропоез *in vitro* і вже через 6 год пригнічує ріст колонієутворювальних одиниць еритропоезу: зменшується кількість колоній. Медіатором ІЛ-1 служить ФНП. Цитокіни ІЛ-1, ФНП можуть пригнічувати продукцію еритропоетину (ЕП). Існує думка, що ІЛ-6 є активатором еритропоезу [2].

Вважають, що специфічного лікування при анемії, яка супроводжує РА, не існує [9]. Призначати препарати заліза також недоцільно. Допомогти таким хворим може еритропоетин в дозі 50–100 ОД/кг 3 рази на тиждень. У разі потреби цю дозу можна збільшити до 150 ОД/кг. В. А. Насонова (1997) вважає, що анемію при РА можна усунути підбором терапії, адекватної активності процесу. Широко застосовується схема етапного лікування РА, яка включає п'ять напрямів [6]. Перша лінія: нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), антималярійні, кортикостероїди внутрішньосуглобово, фізіотерапевтичні процедури. Друга лінія: препарати золота або D-пеніциламін чи сульфасалазин. Третя лінія: метотрексат або циклофосфан. Четверта лінія: пульс-терапія і/або екстракорпоральні методи плюс друга або третя лінії. П'ята лінія: експериментальна біологічна терапія; іонізуюче випромінювання.

У клініці внутрішніх хвороб існує новий напрям — клітинна терапія [8]. Найбільш перспективний шлях — використання дуже молодих, стовбурових клітин людини, "родоначальних" для різних гілок популяцій клітин людини, які майже позбавлені ознак тканинної індивідуальності — Stem Cell Embryo Cell Therapy.

У комплексному лікуванні хворих на РА ми застосували гемопоетичні стовбурові клітини ембріональної печінки людини (ГСК ЕПЛ). Особливість цих клітин полягає в тому, що вони позбавлені антигенів гістосумісності, приживаються, мають крововідновний та замінний ефект [5].

Мета дослідження — покращити загальний стан хворих на РА, відновити гемопоез, зменшити болючість та скованість, збільшити об'єм рухів у суглобах, знизити активність захворювання, досягти ремісії.

Досліджувану групу становили 32 хворих на РА жіночої статі. З I ступенем активності було 4 хворих, з II ступенем — 21, з III ступенем — 7 хворих; повільно прогресуючий перебіг був у 22 хворих, швидко прогресуючий — у 10; серонегативний — у 5 хворих, серопозитивний — у 27 хворих; функціональна недостатність суглобів (ФНС) I ступеня — у 6 хворих (18,7%), II ступеня — у 16 (50%), III ступеня — у 10 (31,2%). У всіх хворих діагноз встановлено відповідно до класифікаційних критеріїв Американської асоціації ревматологів (1987). За віком хворих розподілено так: від 20 до 29 років — 8, від 30 до 39 — 4, від 40 до 49 — 14, від 50 до 59 — 2, 60 років та старше — 4 хворих. Тривалість захворювання від 1,5 до 5 років була у 8 хворих, від 5 до 10 років — у 13, від 10 до 15 років — у 6, від 15 до 25 років — у 5 хворих.

Контрольну групу становили 39 хворих з встановленим діагнозом РА, схожих за віком, статтю, тривалістю захворювання, основними клініко-лабораторними проявами захворювання, ФНС.

Хворі обох груп постійно приймали НПЗП (індометацин, диклофенак, ортофен у середньодобовій дозі 150–200 мг або 4 таблетки сипану на добу) та глюкокортикоїди (середня добова доза 7,5–15 мг), місцево на суглоби застосовували аплікації мазей, які містять НПЗП, компреси з димексидом.

У лікуванні хворих досліджуваної групи ми застосовували ГСК ЕПЛ. Для виділення стовбурових клітин гемопоезу [3] використано групи ембріонів терміном гестації від 7 до 12 тиж. Всі ембріони отримано шляхом перерри-

вання вагітності за соціальними показаннями в медичних закладах від здорових жінок, яких попередньо було обстежено на наявність вірусних та гемічних інфекцій. Клітинні суспензії готували в стерильних умовах за спеціально розробленою методикою з наступним заморожуванням. Кріоконсервовані суспензії зберігаються в банку ембріональних тканин у рідкому азоті при температурі -196°C . Всі суспензії проходять дослідження на бактеріальну стерильність, наявність вірусних та паразитарних інфекцій (Enzygnost Anti-HIV1/HIV2, HbsAg, Anti-HBc, Anti-CMV/IgG +IgM, Anti-Rubella Virus/IgG, Varicella/Zoster, Toxoplasmosis/IgG, IgM), вміст CD 34+ (Progenitor Cells).

Хворим досліджуваної групи одноразово проведена трансплантація ЕКС, яка містить стовбурові клітини ембріонального гемопоезу. ЕКС підбирали індивідуально для кожного хворого. Розморожування клітинної зависі проводили безпосередньо перед трансфузією. ГСК ЕПЛ вводили внутрішньовенно крапельно в ізотонічному розчині натрію хлориду після премедикації димедролом (10 мг) та преднізолоном (30 мг). Швидкість введення клітин — 40 крапель за 1 хв. Об'єм введеної суспензії становив від 0,5 до 2,6 мл з кількістю ядровмісних клітин від $22 \cdot 10^6$ до $180 \cdot 10^6$ в 1 л.

Всім хворим проводили ряд обов'язкових лабораторних досліджень, до них включено і показники периферичної крові, на основі яких можна міркувати про ступінь анемії: гемоглобін, еритроцити, ретикулоцити.

Дослідження вмісту гемоглобіну в периферичній крові проводили уніфікованим гемоглобінцидним методом за допомогою фотоелектроколориметра. У здорових людей нормальною величиною вважається концентрація гемоглобіну в крові 115–145 г/л у жінок та 132–164 г/л у чоловіків за міжнародною системою одиниць — СІ [5].

Фетальний гемоглобін (HbF) визначали за методом Бетке. Принцип цього методу ґрунтується на елюції гемоглобіну кислотою з дозобарвленням мазків, що дає змогу відрізнити еритроцити, які містять фетальний гемоглобін, за збереженим кольором від знебарвлених еритроцитів, які містять гемоглобін А. Збільшення кількості еритроцитів, які містять HbF, спостерігається у новонароджених та у дітей до 5-місячного віку [4].

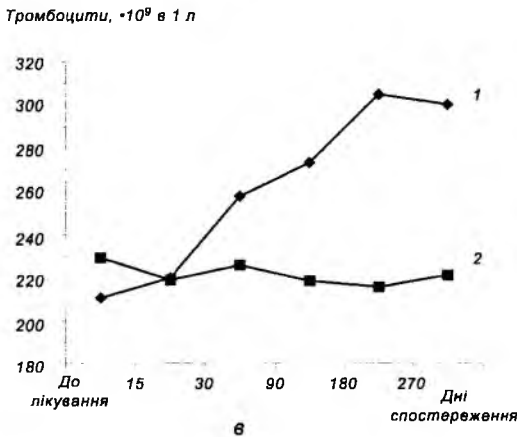
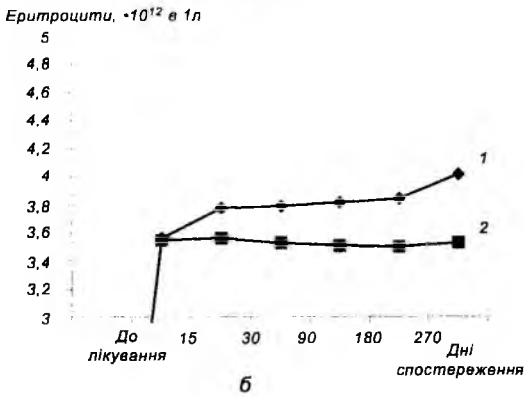
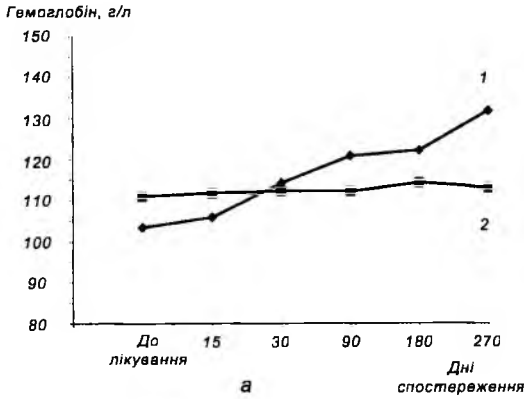
Підрахунок кількості еритроцитів проводили в лічильній камері. Нормальні величини для чоловіків становлять $(4-5,1) \cdot 10^{12}$ в 1 л та $(3,7-4,7) \cdot 10^{12}$ в 1 л для жінок.

Кількість тромбоцитів визначали в мазках крові, забарвлених барвником за Романовським-Гімзою. Кількість тромбоцитів у здорових людей становить $(180-320) \cdot 10^9$ в 1 л. Ретикулоцити визначали в мазках крові, забарвлених барвником азура-1. Кількість ретикулоцитів у здорових становить 0,2–1,2% [4].

В усіх хворих основної групи протягом перших 2–3 діб після трансплантації спостерігався синдром раннього післятрансплантаційного покращання, який проявлявся у зменшенні загальної слабості, зниженні інтенсивності болю, покращанні сну, апетиту, підвищенні працездатності, настрою.

При дослідженні гемоглобіну виявлено, що до лікування його середній вміст в периферичній крові становив $(103,4 \pm 1,5)$ г/л в основній групі і $(112,6 \pm 2,3)$ г/л в контрольній. Ці показники були достовірними між собою ($P=0,001$). Через 30 днів рівень гемоглобіну в основній групі дещо підвищився і становив $(114,2 \pm 2,5)$ г/л, а в контрольній групі знизився до $(106,1 \pm 5,7)$ г/л. Спостереження через 90 днів показало збільшення рівня гемоглобіну в основній групі до $(120,7 \pm 2,3)$ г/л, тоді як в контрольній становив $(108,5 \pm 4,5)$ г/л. На 180-й день спостереження в контрольній групі рівень гемоглобіну досягнув початкових показників — $(112,6 \pm 5,32)$ г/л, в основній збільшився до $(122,1 \pm 2,2)$ г/л.

За весь період спостереження (270 днів) в основній групі ми виявили збільшення рівня гемоглобіну на 28,1 г/л порівняно з вихідними даними — $(131,5 \pm 2,2)$ г/л. В усіх точках спостереження показники були достовірними ($P < 0,01$). В контрольній групі вміст гемоглобіну в периферичній крові залишався без суттєвих змін — $(115,4 \pm 4,0)$ г/л і всі показники були недостовірними. **Зміна рівня гемоглобіну в основній та контрольній групах представлена на рисунку. 4.**



Динаміка рівня гемоглобіну (а) та зміни кількості еритроцитів (б) і тромбоцитів (в) у хворих на ревматоїдний артрит після трансплантації стовбурових клітин ембріонального походження та в контрольній групі:

1 — основна група; 2 — контрольна група

При визначенні кількості еритроцитів вихідні показники в основній та контрольній групах були недостовірні. У групі хворих, яким проведена трансплантація ГСК ЕПЛ, спостерігалось незначне збільшення кількості еритроцитів від $(3,55 \pm 0,06) \cdot 10^{12}$ в 1 л, яке було до лікування, до $(4,01 \pm 0,07) \cdot 10^{12}$ в 1 л, яке реєструвалось через 270 днів після введення ГСК. Кількість еритроцитів в усіх точках спостереження була достовірною порівняно з кількістю еритроцитів до трансплантації ($P < 0,01$). У контрольній групі кількість еритроцитів була на одному і тому ж рівні (рисунок, б).

Зміна кількості тромбоцитів у хворих на РА, яким проведена трансплантація ГСК ЕПЛ, порівняно з контрольною групою наведена на рисунку, в. Проаналізувавши отримані результати в певних точках спостереження за 270 днів, можемо відмітити тенденцію до збільшення кількості тромбоцитів у пацієнтів основної групи, хоча ці показники недостовірні ($P > 0,05$). У той же час у пацієнтів контрольної групи кількість тромбоцитів залишалась майже на одному рівні.

Достовірного зниження чи підвищення кількості ретикулоцитів як у хворих основної, так і контрольної груп не спостерігалось. До лікування кількість ретикулоцитів в основній групі становила $(0,4 \pm 0,06)\%$, в контрольній — $(0,4 \pm 0,05)\%$; на 15-й день спостереження в основній групі — $(1,1 \pm 0,05)\%$, в контрольній — $(1,2 \pm 0,06)\%$; на 30-й день в основній — $(1,4 \pm 0,08)\%$, в контрольній — $(1,2 \pm 0,09)\%$. Через 90 днів кількість ретикулоцитів в обох групах дещо зменшилась і становила $(0,9 \pm 0,05)\%$ в основній та контрольній групах. Через 180 днів кількість ретикулоцитів в основній групі становила $(1,1 \pm 0,06)\%$, в контрольній — $(1,2 \pm 0,09)\%$, через 270 днів — відповідно $(1,2 \pm 0,09)\%$ і $(1,1 \pm 0,07)\%$.

Підтвердженням впливу трансплантації ГСК ЕПЛ на показники периферичної крові є визначення НбФ

в її мазках. До лікування в обох групах НбФ не визначався. Через 15 днів після трансплантації ГСК ЕПЛ вміст НбФ у хворих основної групи становив $(4,4 \pm 0,5)\%$. На 30-ту добу цей показник почав зростати і становив $(5,2 \pm 0,8)\%$, через 90 днів після трансплантації — $(6,4 \pm 0,7)\%$. Найбільший вміст НбФ відмічався на 180-й день $(9,2 \pm 1,1)\%$. Через 270 днів після трансплантації ГСК ЕПЛ спостерігається зменшення вмісту НбФ в 1,7 раза порівняно з вмістом через 180 днів після трансплантації — $(5,3 \pm 0,7)\%$. НбФ у пацієнтів контрольної групи в усіх точках спостереження не виявлявся (таблиця).

Динаміка кількості еритроцитів, що містять фетальний гемоглобін, та ретикулоцитів порівняно з кількістю гемоглобіну та еритроцитів в основній групі хворих

Показник	Норма	До лікування	Після лікування, дні				
			15	30	90	180	270
<i>n</i>		32	32	24	27	20	20
Гемоглобін, г/л	115–145	103,4±1,6	105,9±1,5*	114,2±2,5*	120,7±2,3*	122,1±2,2*	131,5±2,2*
Еритроцити з HbF, %	Не визначено	Не визначено	4,4±0,5	5,2±0,8	6,4±0,7	9,2±1,1	5,3±0,7
Еритроцити, ·10 ¹² в 1 л	3,7–4,7	3,55±0,06	3,77±0,06*	3,78±0,04*	3,81±0,07*	3,84±0,07*	4,01±0,07*
Ретикулоцити, %	0,2–1,2	0,4±0,06	1,1±0,05	1,4±0,08	0,9±0,05	1,1±0,06	1,2±0,09

*P<0,05.

Проаналізувавши результати спостереження за хворими на РА, можемо дійти висновку, що трансплантація стовбурових клітин ембріонального кровотворення позитивно впливає на показники червоної крові та допомагає зменшити прояви анемічного синдрому.

Список літератури

1. Балабанова Р. М., Лоскутова Т. Т., Сайковская Т. В. // Ревматология. — 1990. — № 1. — С. 36–40.
2. Белошевский В. А., Минаков Э. В. Анемия при хронических заболеваниях. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1995. — 96 с.
3. Гриневич Ю. Я., Смыкодуб О. І., Бендюг Г. Д. та ін. Застосування трансплантації кріоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки в комплексному лікуванні хворих на злоякісні утворення: Метод. рекомендації. — К., 1999. — 9 с.
4. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
5. Новицька А. В. // Укр. наук.-мед. молод. журн. — 1999. — № 1–2. — С. 36–40.
6. Ревматические болезни: Руководство для врачей / Под ред. В. А. Насоновой, Н. В. Бунчука. — М.: Медицина, 1997. — 520 с.
7. Рябов С. И., Щерба М. М., Рощина Г. М. // Терапевт. арх. — 1963. — № 5. — С. 82–86.
8. Смыкодуб О. І. // Матер. XIV з'їзду терапевтів України. — К., 1998. — С. 160.
9. Douglas L. Smith. Anemia in the elderly. Am. Fam. Physician. — 2000. — Issue: Oct. 1 (62): — P. 1565–1572.

АНЕМИЧЕСКИЙ СИНДРОМ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

М. П. Демчук, А. И. Смыкодуб (Киев)

В статье описаны основные звенья патогенеза анемии при ревматоидном артрите (РА): синдром повышенной вязкости крови, нарушение обмена железа, блокада железа в ретикуло-эндотелиальной системе, гемолиз, угнетение эритропоэза. Проведена оценка показателей периферической крови гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов в группе больных РА, их изменение под влиянием трансплантации гемопоэтических стволовых клеток эмбриональной печени человека.

THE ANEMIC SYNDROME IN RHEUMATOID ARTHRITIS: CORRECTION WITH TRANSPLANTATION OF HEMOPOITIC STEM CELLS OF HUMAN EMBRIONAL LIVER

М. P. Demchuk, O. I. Smykodub (Kyiv)

The article describes chief links of pathogenesis of anemia in rheumatoid arthritis (RA). These include the blood hyperviscosity syndrome, abnormalities of iron metabolism, blockade of iron in the reticuloendothelial system, hemolysis, depression of erythropoiesis. Indices for the hemoglobin peripheral blood, erythrocytes, reticulocytes, platelets in the group of RA patients were analysed together with their changes under exposure to transplantation of hemopoietic stem cells of human embrional liver.