

Б. С. ИЛЬЯСОВА, Г. М. ШАЙМАРДАНОВА, М. Б. АСКАРОВ,
Б. А. КАЮПОВ, Г. Б. ИСАКОВА, А. Е. ГАЙПОВ, А. С. ИСХАКОВА

(АО Национальный научный медицинский Центр, г. Астана,
РГП на ПХВ НИИ кардиологии и внутренних болезней МЗ РК, г. Алматы,
РГП «Больница Управделами Президента», г. Астана)

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПЕРВИЧНОМ БИЛИАРНОМ ЦИРРОЗЕ

Аннотация

В гепатологии после фундаментальных исследований произведены первые попытки трансплантации стволовых клеток в качестве новой терапевтической стратегии для лечения хронических вирусных заболеваний печени и аутоиммунных поражений печени. *Цель исследования:* показать эффективность применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при первичном билиарном циррозе печени. *Материалы и методы:* в исследование были включены 10 пациентов с первичным билиарным циррозом печени (ПБЦ): 4 пациента – со II морфологической стадией ПБЦ, 2 пациент – с III морфологической стадией ПБЦ, 2 пациента с IV морфологической стадией и 2 – пациентка с overlap поражением (ПБЦ III ст + АИГ). *Показания:* резистентность к стандартной терапии ПБЦ. *Методология:* комбинация базисной терапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. Результаты проведенного исследования по оценке эффективности применения трансплантации аутологичных стволовых гемопоэтических клеток показали результативность по следующим критериями эффективности: уровень общего и прямого билирубина, уровень цитолиза, показателям внутриклеточного холастаза ГГТП и ЩФ, а также снижения гамма-глобулина – маркера аутоиммунного воспаления, уменьшение гистологической активности в ткани печени.

Включение данной технологии в комплексное лечение первичного билиарного цирроза наряду с базисной терапией открывает новые многообещающие перспективы для больных с рефрактерными формами заболевания.

Ключевые слова: первичный билиарный цирроз, аутологичные гемопоэтические стволовые клетки, аутоиммунное воспаление.

Кілт сөздер: біріншілік билиарлық цирроз, аутологиялық гемопоэтикалық бағаналық жасушалар, аутоиммундық қабыну.

Keywords: primary biliary cirrhosis autologous hematopoietic stem cells, autoimmune inflammation.

Человеческие стволовые клетки – это целый спектр клеточных популяций, способных к точной дифференцировке. Данные клетки являются очень привлекательным клеточным ресурсом и теоретически обеспечивает нелимитированное количество первичных клеток.

Стволовые клетки являются многообещающим направлением регенеративной медицины для лечения дегенеративных заболеваний, врожденных нарушений метаболизма и недостаточности органов. В гепатологии после фундаментальных исследований также произведены первые попытки трансплантации стволовых клеток в качестве новой терапевтической стратегии для лечения хронических вирусных заболеваний печени и аутоиммунных поражений печени. Терапия стволовыми клетками играет большую роль в качестве моста к трансплантации или в качестве основной терапии.

Ключевым элементом патогенеза аутоиммунных заболеваний является активация аутоспецифических Т- и В-лимфоцитов. В норме все они подвергаются негативной селекции в первичных лимфоидных органах (тимусе и костном мозг), приводящей к так называемой центральной толерантности.

На экспериментальных моделях (линии мышей с индуцированными аутоиммунными заболеваниями) установлено, что высокодозная иммуноаблативная терапия в сочетании с трансплантацией костного мозга приводит к уничтожению клонов аутоиммунных лимфоцитов. Это ведет к излечению животных с органонеспецифической аутоиммунной патологией, но не решает проблемы при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях.

Одним из таких заболеваний является первичный билиарный цирроз печени (ПБЦ). ПБЦ – это хроническое прогрессирующее заболевание печени неясной этиологии, характеризующееся некрозом внутрипеченочных желчных протоков, хроническим холестазом, портальным фиброзом и циррозом печени (С. Джеймс).

Цель исследования: показать эффективность применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при первичном билиарном циррозе печени.

Цель лечения: Супрессия аутоиммунного воспаления путем восстановления иммунологической толерантности к собственным антигенам.

Материалы и методы: в исследование были включены 10 пациентов с первичным билиарным циррозом печени (ПБЦ): 4 пациента – со II морфологической стадией ПБЦ, 2 пациент – с III морфологической стадией ПБЦ, 2 пациента с IV морфологической стадией и 2 – пациентка с overlap поражением (ПБЦ III ст + АИГ). Уровни цитокинов исследовались с помощью иммуноферментного метода исследования. Экспрессия кластеров дифференцировки лимфоцитами периферической крови проводилась с помощью проточной цитометрии (BD).

Показания: резистентность к стандартной терапии ПБЦ.

Методология: комбинация базисной терапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

Трансплантация аутологичных стволовых гемопоэтических клеток проводилась в 2 этапа:

1 этап – аспирация взвеси костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 200 мл.

- Фенотипирование полученного пунктата с помощью проточной цитометрии (FaxCalibur BD).
- В лаборатории биотехнологии стволовых клеток выделена мононуклеарная (гемопоэтическая) фракция стволовых клеток и прекультивирование в течение 3-х часов.
- Среда культивирования была исследована на содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

2 этап. Трансплантация в количестве $121 \cdot 10^6$ в 200 мл физиологического раствора осуществлена внутривенно.

Результаты проведенного исследования показали, что у пациентов после проведенной трансплантации аутологичных стволовых гемопоэтических клеток достоверно увеличиваются концентрация лейкоцитов периферической крови ($P=0,007$), происходит снижение палочкоядерных лейкоцитов ($P=0,028$), увеличиваются показатели общего белка ($P=0,05$) и альбумина ($P=0,028$).

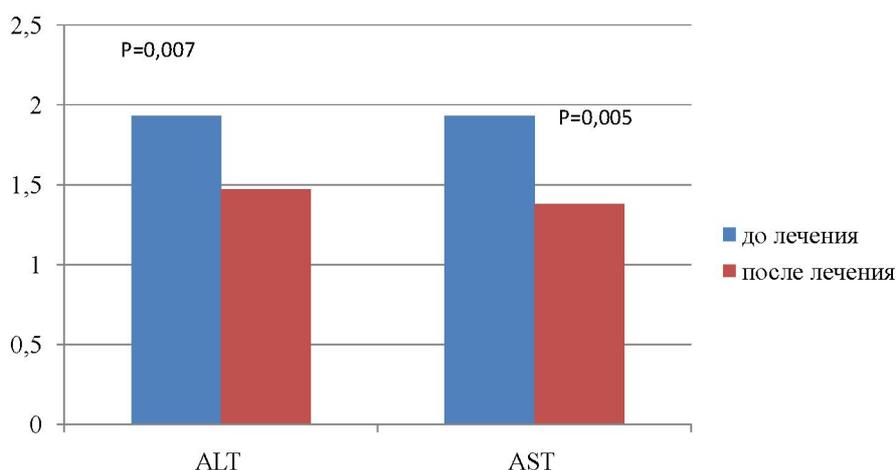


Рисунок 1 – Изменения показателей цитолиза до на 7 день после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

При сопоставлении параметров, характеризующих активность патологического процесса в печени в результате проведенного лечения обнаружено также достоверное снижение трансаминаз (АЛТ: $P=0,007$, АСТ: $P=0,005$), общего билирубина ($P=0,005$), прямого билирубина ($P=0,007$), показателей внутрипеченочного холестаза: гамма-глутаматтранспептидазы ($P=0,007$), щелочной фосфатазы ($P=0,028$).

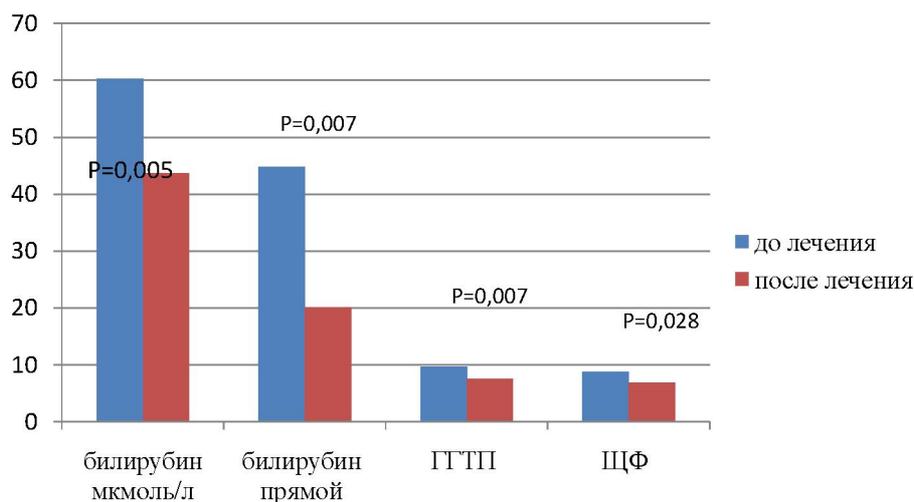


Рисунок 2 – Изменения лабораторных показателей холестаза до и через 7 дней после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

Иммунологические показатели у пациентов с аутоиммунными заболеваниями печени до и после лечения

Показатель	До лечения		После лечения		P
	M±m	Std. Deviation	M±m	Std. Deviation	
CD3-лимфоциты	1,422 ±0,154	0,488	1,575±0,181	0,572	0,059
CD4-лимфоциты	0,707±0,046	0,145	0,768±0,075	0,210	0,260
CD8-лимфоциты	0,718±0,097	0,275	0,878±0,112	0,356	0,122
CD16-лимфоциты	0,367±0,079	0,248	0,457±0,015	0,025	0,593
CD20-лимфоциты	0,393±0,0514	0,163	0,307±0,069	0,217	0,139
CD25-лимфоциты	0,286±0,0848	0,224	0,5033±0,085	0,146	0,283
CD34-клетки	0,100±0,0441	0,139	0,184±0,055	0,173	0,21
CD56-клетки	0,144±0,032	0,071	0,223±0,088	0,153	0,593
HGF	1009,320±174,710	552,482	1312,250±164,299	519,559	0,059
AMA	73,873±24,063	76,094	69,997±25,379	80,254	0,333
γ-глобулины	20,535±1,305	4,125	15,00±1,032	3,263	0,013*

*P < 0.05 (2-tailed).
**P < 0.01 (2-tailed).

При анализе результатов исследования иммунологических параметров обнаружено достоверное снижение гамма-глобулина (P=0,013). Изменения количества других иммунокомпетентных клеток оказались недостоверными.

Через 3 месяца после проведенной терапии были исследованы уровни интерлекинов. Уровни ИЛ-10, ИЛ-12p70, ИЛ-17, ИЛ-2 and ИЛ -4 достоверно не изменились. Уровень ИНФ-γ level достоверно увеличился (p=0,005). Достоверно снизились ИЛ-1β (p=0,006) и ФНО-α (p=0,005).

Результаты морфологического исследования печени, проведенного через 36 месяцев, показали снижение выраженности инфильтрации портальных трактов лимфоцитами, плазмацитами, уменьшение гидрочической дистрофии гепатоцитов.



Рисунок 3 – Результаты морфологического исследования печени у пациентки В через 1,5 года после проведения 2-х трансплантаций аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

Фундаментальные и клинические исследования по изучению свойств стволовых клеток и клинических эффектов различных технологий применения стволовых клеток, проведенные за последние годы, позволяют рассматривать трансплантацию аутологичных стволовых клеток как новое направление в лечении первичного билиарного цирроза печени и аутоиммунного гепатита, поскольку мишенью терапевтического действия данной технологии впервые становится не резидентные иммунокомпетентные клетки печени, как в случае с эффектом УДХК, не пролиферативная и функциональная активность всех иммунокомпетентных клеток (цитостатики, ГКС), а реставрация толерантности иммунной системы к аутоантигенам, которая и является пусковым звеном запуска иммунного ответа и аутоиммунного воспаления.

Результаты проведенного исследования по оценке эффективности применения трансплантации аутологичных стволовых гемопоэтических клеток показали результативность по следующим критериям эффективности: уровень общего и прямого билирубина, уровень цитолиза, показателям внутриклеточного холастаза ГГТП и ЩФ, а также снижения гамма-глобулина – маркера аутоиммунного воспаления, уменьшение гистологической активности в ткани печени.

Включение данной технологии в комплексное лечение первичного билиарного цирроза наряду с базисной терапией открывает новые многообещающие перспективы для больных с рефрактерными формами заболевания.

Резюме

*Б. С. Илясова, Г. М. Шаймарданова, М. Б. Асқаров,
Б. А. Қаяпов, Г. Б. Исакова, А. Е. Гайпов, А. С. Исқақова*

*(«Ұлттық ғылыми медициналық орталығы» АҚ, Астана қ.,
ҚР ДСМ Кардиология және ішкі аурулар ҒЗИ РМК, Алматы қ.,
«Президентті Іс басқармасы ауруханасы» РМК, Астана қ.)*

БІРІНШІЛІК БИЛИАРЛЫҚ ЦИРРОЗДАҒЫ АУТОЛОГИЯЛЫҚ ГЕМОПОЭТИКАЛЫҚ БАҒАНАЛЫҚ ЖАСУШАЛАРДЫ ҚОЛДАНУДЫҢ КЛИНИКАЛЫҚ-ИММУНОЛОГИЯЛЫҚ БАҒАЛАУЫ

Гепатологияда іргелі зерттеулерден кейін бауырдың вирустық созылмасы аурулары және аутоиммундық жасымдалуын емдеу үшін жаңа терапевтік стратегия ретінде бағана жасушаларын трансплантациялауға

алғашқы талпыныстар жасалды. *Зерттеудің мақсаты:* біріншілік билиарлық циррозда аутологиялық гемопоэтикалық бағаналық жасушаларды қолданудың тиімділігін көрсету. *Материалдар және әдістер:* зерттеуге бауырдың біріншілік билиарлық циррозымен (ББЦ) ауыратын 10 науқас алынды. 4 науқаста – ББЦ-тің II морфологиялық сатысы, 2 науқаста – ББЦ-тің III морфологиялық сатысы, 2 науқаста ББЦ-тің IV морфологиялық сатысы және 2 науқаста overlap зақымалуымен (ББЦ III сатысы + АИГ) бар. *Көрсетулер:* ББЦ стандарттық терапиясына резистенттілік. *Әдіснамалар:* базистік терапияның комбинациясы және аутологиялық гемопоэтикалық бағаналық жасушалардың трансплантациясы. Аутологиялық гемопоэтикалық бағаналық жасушаларды трансплантациялауды қолдану тиімділігін бағалауға жүргізілген зерттеулер нәтижелері тиімділіктің мынадай критерийлерін: билирубинның жалпы және тікелей деңгейі, цитолиз деңгейі, ГГТП және ЦФ жасушаішілік холастаз көрсеткіштерін, сондай-ақ аутоиммундық қабынулар маркері – гамма-глобулиннің төмендеуін, бауыр тініндегі гистологиялық белсенділігінің азаюын көрсетті.

Біріншілік билиарлық цирроздың базистік терапиямен қатар кешенді емдеуде аталған технологияны енгізу – аурудың рефрактерлік формаларымен ауыратын науқастар үшін жаңа болашағы зор көп үміттің орындалуына жол ашады.

Кілт сөздер: біріншілік билиарлық циррозда, аутологиялық гемопоэтикалық бағаналық жасушалар, аутоиммундық қабыну.

Summary

*B. S. Ilyassova, G. M. Shaymardanova, M. B. Askarov,
B. A. Kayupov, G. B. Issakova, A. Y. Gaipov, A. S. Isskakova*

(National Scientific Medical Research Center JSC, Astana city,
The Scientific Research Institute of Cardiology and Internal Diseases
under the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty city,
Medical Center of President's Affairs Administration of the Republic of Kazakhstan)

CLINICAL IMMUNOLOGICAL ESTIMATION OF APPLICATION OF AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS

In hepatology after basic research produced the first attempts to transplant stem cells as a new therapeutic strategy for the treatment of chronic viral liver disease and autoimmune liver disease. **OBJECTIVE:** To demonstrate the efficacy of autologous hematopoietic stem cells in primary biliary cirrhosis. **Materials and Methods:** The study included 10 patients with primary biliary cirrhosis (PBC): 4 patients – with morphological stage II PBC, 2 patients – with morphological stage III PBC, 2 patients with stage IV morphological and 2 – a patient with a lesion overlap (PBC III with Art + AIH). **Indications:** resistance to standard treatment of PBC. **Methodology:** A combination of basic therapy and autologous hematopoietic stem cells. The results of the study to assess the efficacy of autologous hematopoietic stem cells have shown the effectiveness of the following performance criteria: the level of total and direct bilirubin level of cytolysis, indicators of intracellular holostaza GGT and alkaline phosphatase, as well as reducing the gamma globlina – a marker of autoimmune inflammation, reduction of histological activity in liver tissue.

The inclusion of this technology in the comprehensive treatment of primary biliary cirrhosis, along with basic therapy opens up promising new perspectives for patients with refractory disease.

Keywords: primary biliary cirrhosis, autologous hematopoietic stem cells, autoimmune inflammation.

Поступила 04.05.2013 г.