

Б. С. ИЛЬЯСОВА

(Алматинский государственный институт усовершенствования врачей, Алматы,
Республика Казахстан)

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ**

Аннотация. В качестве новой терапевтической стратегии для лечения хронических вирусных заболеваний печени и аутоиммунных поражений печени в настоящее время разрабатываются методы клеточной терапии. **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 холестаза 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.

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

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

Два важных событий в 1948 году и 1957 году, которые произошли благодаря Франку Мак-флайну Барнету, стали значимыми в современной иммунологии [1, 2]. В 1948 году Ф. М. Барнет впервые выдвинул и доказал теорию иммунологической толерантности [3]. Его

институтом был внесен большой вклад в наше понимание аутоиммунитета. Впервые в 1957 г. (гипотеза подтверждена в 1959 г. [4]) он предположил, что специфические антигены распознаются иммунной системой до выработки на антиген клональной пролиферации. Второй важный факт: согласно данным концепциям, соматическая мутация большинства клеток антиген-стимулированного клона может привести к aberrantному пролиферативному ответу на собственный антиген. Данный механизм вместе с резистентностью к нарушенному иммунологическому гомеостазу приводит к наработке запрещенного клона, который и лежит в основе аутоиммунных заболеваний.

Первичный билиарный цирроз печени (ПБЦ) – хроническое прогрессирующее заболевание печени неясной этиологии, характеризующееся некрозом внутрипеченочных желчных протоков, хроническим холестазом, портальным фиброзом и циррозом печени (С. Джеймс).

Аутореактивные CD8 Т-лимфоциты, характерные для ПБЦ, являются главными эффекторами повреждения ткани при ПБЦ. Подобно CD4 аутореактивным Т-клеткам в печени и периферической крови наблюдается 10-кратное повышение специфических CD8 Т к PDC-E2. Более того, чаще всего повышенный уровень аутореактивных PDC-E2 – специфических CD8 Т-лимфоцитов достоверно выше на ранней стадии заболевания, чем на более поздних стадиях. Аутореактивные CD8 Т – лимфоциты при ПБЦ обладают специфической цитотоксичностью против PDC-E2 антигена и продуцируют IFN-g в большей степени, чем IL-4/IL-10 цитокины [5].

Естественный иммунитет как активатор аутоиммунного ответа играет значительную роль в патогенезе ПБЦ [6]. Печень является большим органом естественного неспецифического иммунитета, содержащим большую популяцию клеток неспецифического звена иммунитета, включая NK и NKT клетки. Как и при других аутоиммунных заболеваниях, активация неспецифического иммунитета инициирует и опосредует прогрессирование повреждения печени [7], и ПБЦ имеет частично черты эпителиоидной гранулемы с повышенным уровнем поликлональных антител класса IgM, гиперчувствительностью иммунной системы к CpG, повышенным уровнем в крови и печени NK-киллеров [8] и повышенным уровнем цитокинов [7]. Повышение уровня сыворотки поликлональных IgM при ПБЦ не зависит от AMA или ANA статуса [9], и снижается обычно во время лечения [10]. Появление повышенного уровня IgM является вторичным и появляются вторично при формировании иммунного ответа В-клеток памяти на специфические бактериальные молекулы [11]. Следовательно, экспрессия CpG motifs В-лимфоцитами повышает количество Т-клеточных рецепторов TLR9 и молекул CD86, что в свою очередь обуславливает повышение продукции AMA.

Другие факторы неспецифического иммунитета такие, как моноциты также включаются в патогенез ПБЦ, усиливая провоспалительную активность при ПБЦ. Функционально, моноциты становятся активными под действием патоген-ассоциированной стимуляции через Т-клеточные рецепторы и приводят к освобождению провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1, IL-6, IL-18, IL-12, and TNF- α , которые запускают адаптивный иммунитет против патогенов [12].

Лечение больных ПБЦ предусматривает меры, воздействующие на основные звенья патогенеза заболевания и направленные на профилактику или замедление его прогрессирования, симптома-тическую терапию зуда и повышенной утомляемости, позволяющую улучшить качество жизни больных, и борьбу с осложнениями. Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) – единственный препа-рата в США, разрешенный FDA для лечения ПБЦ. УДХК назначают также в сочетании с другими препаратами, включая преднизолон, тбudesонид, азотиаприн, метотрексат, колхицин. В терми-нальной стадии трансплантация печени – единственный эффективный метод лечения больных ПБЦ, а также его осложнений и симптомов, не поддающихся лечению другими методами.

Аутологичные гемопоэтические клетки способны рестабиллизировать иммунологическую толерантность: аутологичные стволовые клетки приводят к увеличению количества регуляторных клеток FOXP3-позитивных Т-клеток [22], которые являются важными в запуске толерантности, реактивация тимической функции. После приема данной терапии происходит развитие толерант-ности естественного звена иммунной системы. Об этом свидетельствуют миграция тимических клеток, характеризующихся экспрессией молекулы CD31 и TREСэксцизией Т-клеточных рецеп-торов, а также диверсия Т-клеточных рецепторов в течение года после трансплантации аутоло-гичных гемопоэтических клеток без обострения аутоиммунного заболевания [23, 24], комплимент-опосредованного лизиса и апоптоза, персистированием антилимфоцитарных глобулинов, аутоанти-тел-продуцирующих клеток в плазме [25].

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

Цель лечения: Супрессия аутоиммунного воспаления путем восстановления иммунологи-ческой 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 мор-фологической стадией ПБЦ, 2 пациента с IV морфологической стадией и 2 – пациентка с overlap поражением (ПБЦ III ст + аутоиммунный гепатит). 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 гемопоэти-ческих 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 ($P=0,028$).

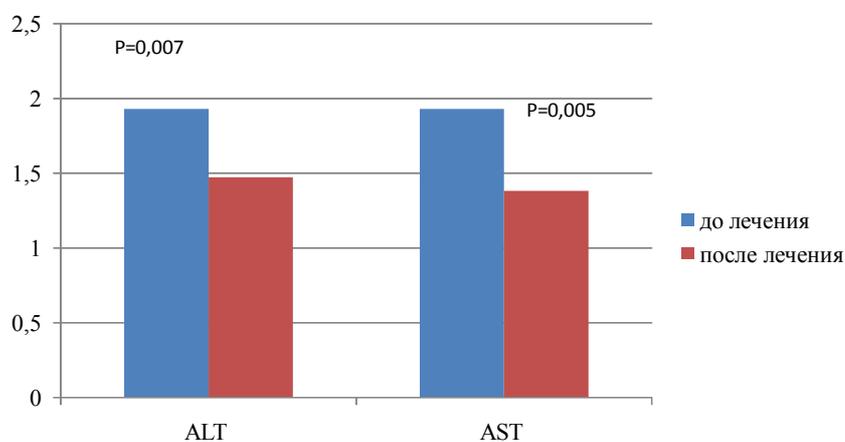


Рисунок 1 – Изменения показателей цитолиза до на 7 день

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 ($P=0,028$).

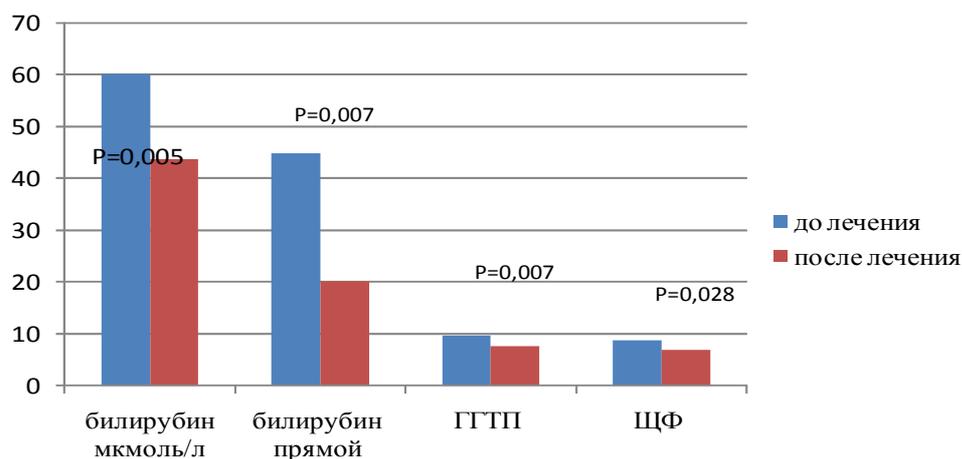


Рисунок 2 – Изменения лабораторных показателей холестаза до и через 7 дней после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

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-1 β ($p=0,006$) и ФНО- α ($p=0,005$).

Таблица 1 – 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±,0514	0,163	0,307±0,069	0,217	0,139
CD25-лимфоциты	0,286±,0848	0,224	0,5033±0,085	0,146	0,283
CD34-клетки	0,100±,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
АМА	73,873±24,063	76,094	69,997±25,379	80,254	0,333
g-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).					

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



Рисунок 3 – Результаты морфологического исследования печени у пациентки В через 1,5 года

после проведения 2-х трансплантаций 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.

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.

Применение трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при первичном билиарном циррозе резистентном к базисной терапией представляется перспективным методом лечения.

REFERENCES

- 1 Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity*. **2008**; 41(2): 123–32.
- 2 Mackay IR. Autoimmunity since the 1957 clonal selection theory: a little acorn to a large oak. *Immunol Cell Biol*. **2008**; 86(1): 67–71.
- 3 Cohn M, Mitchison NA, Paul WE, Silverstein AM, Talmage DW, Weigert M. Reflections on the clonal-selection theory. *Nat Rev Immunol*. **2007**; 7(10): 823–30.
- 4 Neuberger MS. Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol*. **2008**; 86(2): 124–32.
- 5 Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest*. **2002**; 109(9): 1231–40.
- 6 Zuin M, Giorgini A, Selmi C, Battezzati PM, Cocchi CA, Crosignani A, et al. Acute liver and renal failure during treatment with buprenorphine at therapeutic dose. *Dig Liver Dis*. **2008**
- 7 Selmi C, Lleo A, Pasini S, Zuin M, Gershwin ME. Innate immunity and primary biliary cirrhosis. *Curr Mol Med*. **2009**; 9(1): 45–51.
- 8 Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. **2006**; 26(4): 232–40.
- 9 Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. **2005**; 353(12): 1261–73.
- 10 Pares A, Caballeria L, Rodes J, Bruguera M, Rodrigo L, Garcia-Plaza A, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. **2000**; 32(4): 561–6.
- 11 Kikuchi K, Lian ZX, Yang GX, Ansari AA, Ikehara S, Kaplan M, et al. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. **2005**; 128(2): 304–12.
- 12 Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. **2005**; 42(4): 802–8.
- 13 D. Bryder, D. J. Rossi, and I. L. Weissman, “Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell,” *American Journal of Pathology*, **2006**, vol. 169, no. 2, pp. 338–346.
- 14 A. C. Piscaglia, M. Novi, M. Campanale, and A. Gasbarrini, “Stem cell-based therapy in gastroenterology and hepatology,” *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies*, **2008**, vol. 17, no. 2, pp. 100–118.
- 15 M. Mimeault, R. Hauke, and S. K. Batra, “Stem cells: a revolution in therapeutics—recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies,” *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2007**, vol. 82, no. 3, pp. 252–264
- 16 A. Tocci and L. Forte, “Mesenchymal stem cell: use and perspective,” *Hematology Journal*, **2003**, vol. 4, no. 2, pp. 92–96.
- 17 Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt et al., “Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow,” *Nature*, **2002**, vol. 418, no. 6893, pp. 41–49.
- 18 Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt et al., “Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow,” *Nature*, **2002**, vol. 418, no. 6893, pp. 41–49.
- 19 K.-A. Cho, S.-Y. Ju, S. J. Cho et al., “Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow,” *Cell Biology International*, **2009**, vol. 33, no. 7, pp. 772–777.
- 20 Tyndall A, Black C, Finke J, Winkler J, Mertlesmann R, Peter HH, et al. Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation. *Lancet*. **1997**; 349(9047): 254.

21 Farge D, Labopin M, Tyndall A, Fassas A, Mancardi GL, van Laar JM, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years of experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica*. **2010**;95(1):284–292.

22 Roord ST, de Jager W, Boon L, Wulffraat N, Martens A, Prakken B, et al. Autologous bone marrow transplantation in autoimmune arthritis restores immune homeostasis through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood*. **2008**;111(10):5233–41.

23 Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. **2009**;113(1):214–23.

24 Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med*. **2005**;201(5):805–16.

25 Hoyer BF, Mumtaz IM, Yoshida T, Hiepe F, Radbruch A. How to cope with pathogenic long-lived plasma cells in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. **2008**;67(Suppl 3):87–9.

Резюме

Б. С. Илясова

(Алматы мемлекеттік дәрігерлердің білімін жетілдіру институты, Алматы, Қазақстан Республикасы)

БҮЙРЕКТІҢ АУТОИММУНДЫ АУРУЛАРЫНДА АУТОЛОГИНДІ ГЕМОПОЭТИКАЛЫҚ

БАҒАНАЛЫҚ ЖАСУШАЛАРДЫҢ ТРАНСПЛАНТАЦИЯСЫ

Қазіргі уақытта бүйректің вирустық созылмалы аурулары мен бауырдың аутоиммунды зақымдануын емдеу үшін жаңа сапалы терапиялық стратегия ретінде жасушалық терапиялық тәсілдер жасалуда. **Зерттеу мақсаты:** Бауырдың бірінші реттік билиарлы циррозында аутологинді гемопозетикалық стволды жасушаны қолданудағы пайдасын көрсету. **Тәсілдер мен материалдар:** Зерттеу кезінде бауырдың бірінші реттік би-лиарлы циррозды 10 науқасқа зерттеу жүргізілді; III морфологиялық стадия бойынша 4 науқас; морфоло-гиялық стадия бойынша 2 науқас; 2 науқас IV морфологиялық стадия бойынша және 2 overlap зақымдануы-мен зерттеуге алынды. **Көрсетілімі:** Бауырдың бірінші реттік билиарлы циррозында стандартты терапияға резистентті. Әдістемелері: базисті терапияның комбинациясы және аутологинды гемопозетикалық бағаналық жасушаның трансплантациясы. Зерттеулер нәтижесі кезінде қолданылуды бағалауда аутологинды гемо-позетикалық бағаналық жасушалардың трансплантациясы мынандай критерийлер бойынша пайдалы нәтиже көрсетті: билирубиннің жалпы және тікелей сатысы, цитолиздің

шегі, ішкі жасушалық холестааздың көрсет-кіші, сондай-ақ гамма-глоблиннің төмендеуі – аутоиммунды қабыну маркері, бауыр тініндегі гисталогиялық белсенділіктің азаюы.

Бұл технологияға бірінші реттік билиарды циррозды рефракті ауру түрімен кешенді емдеудің базисті терапия ретімен көптеген жаңа бағдарлар ашылғандығы айтылады.

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

Summary

B. S. Ilyassova

(Almaty state Institute of improvement of doctors, Almaty, Republic of Kazakhstan)

TRANSPLANTATION OF AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN AUTOIMMUNE LIVER DISEASES

As a new therapeutic strategy for the treatment of chronic viral liver diseases and autoimmune liver lesions at present, methods of cellular therapy. Research goal: to show the effectiveness of the application of autologous hematopoietic stem cells in primary biliary cirrhosis of the liver. Materials and methods: the study included 10 patients with primary biliary cirrhosis (PBC): 4 patient from II morphological stage of the PBC, 2 patient # - III morphological stage of the PBC, 2 patients with IV morphological stage 2 – the patient with overlap defeat (PBC III +AIG). Indications: resistance to standard therapy for PBC. Methodology: a combination of basic therapy and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. The results of the study assessing the efficacy of autologous transplantation of hematopoietic stem cells have shown effectiveness in the following performance criteria: the level of total and direct bilirubin, level of cytolysis, indicators of intracellular cholestasis GGT and alkaline phosphatase and also to reduce the gamma-globulina marker of autoimmune inflammation, reduction of histological activity in the liver tissue.

The inclusion of this technology in complex treatment of primary biliary cirrhosis, along with basic therapy opens new promising prospects for patients with refrakternami forms of the disease.

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

Поступила 31.10.2013 г.