

А.И. Смикодуб

ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО АУТОИММУННОГО АКТИВНОГО ГЕПАТИТА ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ КЛЕТОЧНЫМИ СУСПЕНЗИЯМИ

Клиника клеточной терапии Национального медицинского университета, г. Киев

Хронический аутоиммунный активный гепатит (ХАГ) характеризуется непрерывным печеночноклеточным некрозом, воспалением, развитием цирроза и стойкой печеночной недостаточности. Его высокая летальность (до 40% в первые 6 месяцев течения процесса [1]) и устойчивость к терапии диктует необходимость поиска новых эффективных методов лечения.

Мы предложили использовать эмбриональные клеточные суспензии (ЭКС), приготовленные из печени или селезенки. Они содержат большое количество стволовых клеток эмбрионального гемопоэза и не вызывают иммунного ответа ввиду более поздней экспрессии антигенов гистосовместимости. Трансплантированные в организм реципиента эмбриональные стволовые клетки распределяются, размножаются и восстанавливают утраченные функции тканей: восстанавливают иммунную систему и кроветворение, приостанавливают развитие аутоиммунного воспалительного процесса, обладают трофическим действием, вырабатывают биологически активные вещества: интерлейкины, интерфероны, медиаторы, факторы роста клеток крови, нервов, сосудов и т.д..

Клинические исследования по использованию эмбриональных стволовых клеток при лечении ряда аутоиммунных заболеваний проводятся в Клинике клеточной терапии Национального медицинского университета с 1994 года.

Разработан метод лечения пациентов с сахарным диабетом I типа, имеется положительный опыт лечения аутоиммунных поражений кишечника, нервной системы, соединительной ткани [2,3], получены международные и отечественные патенты [4,5].

Материалы и методы. Под наблюдением находились 6 пациентов с хроническим активным гепатитом. В Клинику клеточной терапии они обратились через 4-11 месяцев от начала заболевания. У всех пациентов процесс оценивался как активный; у 2-х пациентов он был выраженный, у 4-х пациентов – умеренный.

Отсутствие маркеров вирусного гепатита, высокий иммунорегуляторный индекс и присутствие антител к гладкой мускулатуре у всех больных позволили говорить об аутоиммунном гепатите. 5 пациентов длительно принимали глюкокортикоиды в дозах 25-40 мг эквивалентно преднизолону. Трем пациентам были проведены курсы лечения азатиоприном без видимого улучшения. Всем пациентам в течение 4-6 недель перед трансплантацией проводилась дезинтоксикационная терапия и был назначен преднизолон в дозе 15-25 мг с целью проведения противовоспалительной терапии и кондиционирования. ЭКС вводились внутривенно пяти пациентам однократно, одному - двукратно.

Клеточные суспензии из эмбриональной печени готовили в стерильных условиях бокса по стандартной методике, включающей следующие этапы: выделение эмбриональной печени, гомогенизация и фильтрация. Криоконсервированные суспензии хранили в банке эмбриональных тканей в жидком азоте при температуре -196°C.

Суспензия проходила двойной бактериальный и вирусологический контроль. Пренатальная диагностика включала в себя исследования на наличие сифилиса, ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита В и С. Проводили исследования содержимого контейнеров на бактериальную стерильность. Фетальная диагностика включала исследования на наличие ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита В и С, цитомегаловируса, вируса краснухи, герпеса и токсоплазмоза. Кровь доноров исследовалась также на ВИЧ-инфекцию через 90 дней после проведенной операции прерывания беременности.

Для трансплантации отбирали клеточные суспензии 5-8 недель гестации, с количеством клеток от 5 до 90×10^6 в 1 мл, в объеме от 1 до 4,5 мл. Размороженную взвесь клеток вводили внутривенно капельно однократно через систему для переливания крови в 100 мл изотонического раствора хлорида натрия со скоростью 30-40 капель в минуту. Предварительно проводили премедикацию - внутривенно струйно димедрол и преднизолон в возрастных дозировках [6].

Активность ферментов-индикаторов цитолизического синдрома, аспаратаминотрансферазы (АсАТ, 2.6.1.1), аланинаминотрансферазы (АлАТ, 2.6.1.2), γ -глутамилтрансферазы (ГТТФ, 2.3.2.2) определялась спектрофотометрически, тимоловерональная проба проводилась по Маклагану, билирубин крови – по Ендрассику, другие показатели общепринятыми клиническими методами. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов, а также антител к гладкой мускулатуре проводилось с помощью непрямого иммунофлюоресцентного теста с панелями моноклональных антител серии Leu (Becton Dickinson) на лазерном проточном цитофлуориметре Facstar Plus (Becton Dickinson).

Обработка данных проводилась с помощью статистического пакета CSS. Достоверность оценивалась по критерию Стьюдента. Статистически достоверными считались различия при $p < 0,05$. В качестве показателей нормы иммунологического анализа использовались результаты обследования здоровых людей.

Результаты. У всех пациентов после трансплантации ЭКС наблюдали проявления синдрома раннего посттрансплантационного улучшения, а также синдрома психофункциональных изменений [7]. Уже через несколько часов отмечались улучшение общего самочувствия, уменьшение слабости, потливости, снижение температуры, улучшение аппетита, сна. В течение первого месяца посттрансплантационного периода проявлялись симптомы улучшения

эмоционального статуса, уменьшение чувства тревоги, страха. Эти изменения сохранялись на протяжении всего периода затухающего обострения.

В посттрансплантационном периоде мы наблюдали изменения показателей клеточного иммунитета, свидетельствующих о положительной динамике: увеличение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов и нормализация соотношения субпопуляций Т-хелперов и Т-супрессоров (табл. 1). Иммунорегуляторный индекс (соотношение лимфоцитов CD4+/CD8+) после трансплантации уменьшился в сравнении с исходным уровнем в 1,5-3 раза на протяжении всего срока исследования. Количество NK-клеток (CD16+) в посттрансплантационном периоде возрастало. Максимальное их содержание наблюдалось в конце года наблюдения (увеличилось на 76% по сравнению с уровнем до трансплантации). В течение срока наблюдения также возросло количество В-лимфоцитов (CD19+) в 2,0-2,6 раза.

Исследование концентрации белка и белковых фракций крови показало постепенное снижение количества белка, увеличение содержания альбуминов и снижение доли глобулинов, особенно β - и γ -фракций. Белковый коэффициент к сроку 12 мес увеличился в среднем в 1,8 раза по сравнению с уровнем до трансплантации. Тимоловая проба за время наблюдения уменьшилась в 3 раза, но через 12 мес еще оставалась в 1,5 раза выше верхней границы нормы.

Через 2 недели после проведения трансплантации отметили достоверное снижение уровня общего, непрямого и прямого билирубина. Нормализация уровня прямого билирубина отмечалась через 3 месяца и оставалась в пределах нормы в течении последующего наблюдения, а уровень общего и непрямого билирубина в этот же период был выше верхних границ нормы соответственно на 23% и 46%. На таком же уровне эти показатели оставались до конца срока исследования.

Показатели активности мезенхимально-воспалительного синдрома – С-реактивный протеин, серомукоиды, белок и белковые фракции начали снижаться уже к концу 2-й недели.

У 4 пациентов была достигнута ремиссия, у одного пациента ремиссия расценивалась как неполная, в виду оставшейся незначительной активности воспалительного процесса. Двум пациентам после двух месяцев наблюдения были проведены повторные трансплантации ЭКС того же генетического происхождения, и в результате также была достигнута ремиссия заболевания.

У пациентов с явлениями васкулитной сыпи по типу капилляротоксикоза в посттрансплантационном периоде не было свежих подсыпаний, а имевшиеся кровоизлияния быстро перешли в очаги гиперпигментации.

У всех пациентов значительно уменьшились проявления депрессивных и невротических состояний. В настоящее время все пациенты живы, наблюдение продолжается.

Дополнительную информацию о методе лечения ЭКС вы можете получить на нашем Web-сайте: www.emcell.com.

Выводы. Использование ЭКС, содержащих стволовые клетки гемопоэза при ХАГ позволяет остановить прогрессирование аутоиммунного воспалительного процесса. Необходимым условием является предварительный прием преднизолона в дозе 15-25 мг в течение 4-6 недель.

После трансплантации у пациентов с ХАГ в течение 3-х месяцев наблюдается восстановление показателей клеточного иммунитета: увеличивается количество лимфоцитов, Т-лимфоцитов, субпопуляций Т-хелперов и Т-супрессоров, нормализация их соотношения. Восстанавливается также популяция В-лимфоцитов и NK-клеток. Эти эффекты носят стойкий характер.

Усиление клеточного иммунитета в первые дни приводит к усилению цитолиза гепатоцитов, находящихся в состоянии апоптоза. В дальнейшем происходит уменьшение активности процесса и нормализация уровней трансаминаз. Через 1 месяц после трансплантации уменьшаются проявления желтушного и холемического синдромов, восстанавливается функциональная активность гепатоцитов.

Таблица 1
Иммунологические исследования крови пациентов с хроническим активным гепатитом, которым была проведена трансплантация ЭКС

Показатели	Нормативные данные	Сроки наблюдений					
		При поступлении n=7	Перед трансплантацией x10 ⁹ /л n=7	Через 2 недели x10 ⁹ /л n=7	Через 1 месяц x10 ⁹ /л n=7	Через 3 месяца x10 ⁹ /л n=6	Через 12 месяцев x10 ⁹ /л n=6
Лейкоциты, x10 ⁹ /л	x10 ⁹ /л	10,6±1,3	9,5±1,4	6,4±0,6	5,3±1,1	5,5±2,0	4,7±1,6*
Кол-во лимфоцитов, %		12±4	12±4	21±8	32±9	26±7	31±8
Абсолютное кол-во лимфоцитов		1,1±0,3	1,1±0,4	1,4±0,5	1,5±0,3	1,5±0,3	1,6±0,6*
T-лимфоциты (CD3+)	1,35±0,02	0,26±0,04Т	0,28±0,05Т	0,82±0,12Т*	0,71±0,14*Т	1,2±0,28*	1,1±0,17*
T-хелперы (CD4+)	0,86±0,01	0,32±0,10Т	0,44±0,11Т	0,58±0,11Т	0,49±0,14Т	0,73±0,13	0,67±0,2
T-супрессоры /CD8+)	0,52±0,01	0,18±0,04Т	0,12±0,04+	0,44±0,16	0,37±0,13	0,62±0,2*	0,68±0,2*
№С - натуральные киллеры (CD16+)	0,39±0,011-	0,26±0,04^	0,21±0,05	0,31±0,13	0,29±0,07	0,34±0,15	0,39±0,15
Хелперно-супрессорное отношение (CD4+/CD8+)	1,34±0,02	1,86±0,30^	3,6±0,7	1,2±0,2	1,3±0,3	2,3±0,6	1,0±0,3
В-лимфоциты (CD19+)	0,21±0,08	0,09±0,02	0,11±0,03	0,27±0,03*	0,22±0,06	0,23±0,06	0,30±0,02*

* p<0.05 - по сравнению с исходным уровнем (до трансплантации). 1

• " p<0.05 в сравнении с уровнем в группе здоровых

Таблица 2

Биохимическое исследование крови пациентов с хроническим активным гепатитом, которым была проведена трансплантация ЭКС

Показатели	Показатели нормы	Сроки наблюдений					
		При поступлении n=7	Перед трансплантацией n=7	Через 2 недели n=7	Через 1 месяц n=7	Через 3 месяца n=6	Через 12 месяцев n=6
Билирубин общий, ммоль/л	3,4-17,1	222±81	170±50	55±16	26±6*	21±5*	21±3*
Билирубин непрямой, ммоль/л	3,4-13,7	163±51	139±34	31±16	16±3	21±4*	22±3*
Билирубин прямой, ммоль/л	0-3,4	61±18	32±16	25±12*	8±3*	2±1,1*	0,5±0,2*
АЛТ, нмоль/с*л	28-190	2103±468	2024±375	3303±522	820±180*	203±50*	61±27*
АСТ, нмоль/с*л	28-190	1018±363	927±268	1127±470	302±144 *	127±44*	85±19*
ГГТФ, нмоль/с*л	250-1767	11268±2704	10287±3019	14790±4228	8394±2202	3611±1714	1017±218*
Тимоловая проба, ед.	0-4	18±4	18±3	18±4,2	11,2±3,4	8±5,1	6±1,6*
Общий белок, г/л	65-85	73±18	73±17	71±15	61±13	65±16	66±11
Альбумины, % Глобулины, % Альфа1, %	50-70	31±6 67±8 8±3	34±6 65±12 7±2	48+9 54±11	50±18* 47±12	47±15 54±14	49±14 47±11
Альфа2, % Бета, % Гамма, %	3-6 9-15 8-18 15-25	11±6 23±8 32±11	13±6 17±6 31±13	3±2 11±5 15±7 24±7	6±3 13±5 19±7 24±8	6±3 11±4 16±4 28±5	5±3 11±6 14±6 22±6
Белковый коэффициент	1,2-2,0	0,49±0,15	0,53±0,17	0,75±0,11	1,08±0,27	0,92±0,32	1,01±0,24
Серомукоиды, ммоль/л.	2,0-2,33	3,1±1,5	3,2±1,7	3,5±2,1	1,7±0,5	1,5±0,3	1,7±0,4
CRP		2-3+	2-3+	1-2+	1+	1+	1+

* p<0.05 в сравнении с исходным уровнем (до трансплантации).