

ІМУНОРЕГУЛЯТОРНИЙ ВПЛИВ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН В ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

М.П. Демчук, О.І. Смикодуб

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,
Блок клітинної терапії КМКЛШМД, м. Київ

Резюме

В лікуванні групи хворих на ревматоїдний артрит були використані стовбурові клітини ембріонального походження. В результаті спостереження виявлено їх імунокоригуючий вплив на клітинну та гуморальну ланку імунітету, зниження активності прозапальних цитокінів ФНП-альфа, ІЛ-1, гамма-ІФ та ІЛ-8, збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ-10, покращення функціональних можливостей.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, лікування, стовбурові клітини, цитокіни.

Вступ

Ревматоїдний артрит (РА) — автоімунне захворювання невідомої етіології, яке характеризується симетричним хронічним ерозивним артритом периферичних суглобів та системним запальним ураженням внутрішніх органів. В основі патогенезу РА лежить складний взаємодоповнюючий вплив генетично детермінованих та набутих дефектів нормальних імунорегуляторних механізмів, що формують патологічну активацію імунної системи у відповідь на потенційно патогенні, а нерідко і фізіологічні стимули. Вважають, що на ранній стадії РА ураження суглобів зв'язано з неспецифічною запальною реакцією, індукованою різними стимулами, яка в генетично схильних індивідуумів призводить до патологічного процесу у вигляді утворення пануса.

Імунорегуляторний компонент РА визначається активацією CD4+ Т-лімфоцитів по Th1 типу — порушення балансу синтезу «прозапальних» (синтез інтерлейкіну (ІЛ)-2, інтерферону (ІФ)-гамма, ІЛ-17, ІЛ-18) та «протизапальних» цитокінів (Th2 типу) (перших синтезується більше). Центральне місце серед «прозапальних» цитокінів займає ФНП-альфа, а також ІЛ-1, які індукують синтез медіаторів, що підтримують запалення та визивають деструкцію суглобів. Імунорегуляторні порушення при РА виражаються в суттєвому зниженні, в порівнянні зі здоровими, рівня Т-супресорів, особливо при серопозитивному, а при серонегативному Т-хелперної функції лімфоцитів. Основним напрямком імунотерапії повинна бути, імунодепресія, пригнічуюча гіперактивацію В і Т імунної відповіді (особливо антигензалежної) та імунокорекція, точкою прикладення якої є дисбаланс Т-субпопуляцій та Т, В клітин. Імунологічні порушення сприяють хронізації основного захворювання та розвитку ускладнень. При РА запальний процес в тканинах починається з інфільтрації синовіальної оболонки лімфоцитами. Хвороба, починаючись з суглобового синдрому, поступово набуває рис системності:

появляються ревматоїдні вузли, лімфаденопатія, ураження внутрішніх органів [1].

Недिवлячись на досягнення в лікуванні РА, в багатьох пацієнтів захворювання рефрактерне до терапії, що проводиться, тому постійно триває пошук нових підходів. Одним з них є застосування стовбурових клітин (СК) різного походження [2].

Матеріали і методи

В лікуванні хворих на РА нами були використані СК ембріонального походження. В групу дослідження ввійшли дорослі пацієнти віком від 19 до 65 років, 30 жінок та 6 чоловіків, що склали основну групу та 30 пацієнтів контрольної групи такого ж віку з встановленим на основі діагностичних критеріїв РА, тривалістю захворювання від 1,5 до 20 років. Основним критерієм відбору слугувала неефективність чи непереносимість загальноприйнятої терапії, значне обмеження функціональних можливостей. В лікуванні застосовувались кріоконсервовані ембріональні клітинні суспензії (ЕКС), що містять СК, отримані з печінки трупів ембріонів людини 4–8 тижнів гестації, після штучного переривання вагітності в здорових жінок, обстежених на наявність вірусних та гемічних інфекцій.

Тип та об'єм суспензії, кількість клітин для введення підбирали індивідуально для кожного пацієнта. Життєздатність трансплантату оцінювали за кількістю ядровмісних та моноклеарних клітин, за вмістом в суспензії прогеніторних клітин CD34 та за здатністю клітин до колонієутворення — вміст колонієутворюючих одиниць гранулоцит-макрофаг (CFU-GM) і колонієутворюючих одиниць гранулоцит, еритроцит, моноцит-макрофаг (CFU-GEMM). Контейнери з суспензією, що містить СК безпосередньо перед трансфузією виймали з рідкого азоту, за спеціальною методикою проводили розморожування і вводили внутрішньовенно крапельно через систему для переливання крові на фоні фізіологічного розчину після внутрішньовенної премедикації —

10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Трансплантація ЕКС не потребує спеціальної імунологічної підготовки пацієнтів, яка проводиться при використанні СК іншого походження, що робить її більш доступною для великої кількості хворих на РА та спрощує схему ведення пацієнтів в посттрансплантаційному періоді [3].

До та після проведення трансплантації хворі знаходились під спостереженням. обов'язковими були клінічне та лабораторне визначення ступеня активності процесу, проводили оцінку функціональних можливостей. Повне лабораторне обстеження включало: загальний аналіз крові з визначенням рівня фетального гемоглобіну, дослідження білкових фракцій, визначення рівня циркулюючих імунних комплексів, титру ревматоїдного фактору, вмісту імуноглобулінів класу А, М, G та субпопуляцій Т- та В-лімфоцитів, вивчення апоптозу та ін. В частини пацієнтів (n=12 з основної групи та n=10 з контрольної групи) за допомогою імуноферментного аналізу було проведено дослідження рівня сироваткових цитокінів в периферичній крові. Всі дослідження проводили перед проведенням лікування, через 2 тижні після лікування, через 1 місяць, а потім кожних наступних 3 місяці.

У всіх пацієнтів після введення ЕКС спостерігався синдром раннього посттрансплантаційного покращання у вигляді збільшення фізичної та розумової активності, зменшення тривалості ранкової скованості, покращання сну, апетиту. Поступово знижувалась активність захворювання за клінічними та лабораторними показниками запального процесу. В жодному з випадків не спостерігались непереносимість або алергічні прояви в процесі чи після проведення трансплантації СК, не були відмічені інфекційні епізоди, пов'язані з введенням ЕКС, не спостерігалась реакція ТПХ як при первинному, так і при повторному введенні ЕКС.

Від усіх учасників дослідження була отримана поінформована згода в письмовій формі.

Результати та їх обговорення

При аналізі Т-клітинної ланки імунітету в хворих досліджуваної групи до лікування спостерігалось зменшення вмісту Т-лімфоцитів — CD3+, Т-хелперів CD4+, Т-супресорів CD8+ приблизно на 65 % від їх кількості в здорових людей. Через 30 днів після лікування абсолютний вміст Т-лімфоцитів CD3+ та Т-хелперів CD4+ недостоєрно зменшився до $(0,41 \pm 0,03) \times 10^9 / \text{л}$ та $(0,27 \pm 0,02) \times 10^9 / \text{л}$ відповідно. Абсолютна кількість Т-супресорів достовірно зменшилась до $(0,14 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$ ($P < 0,001$)

Спостерігається зростання CD3+ на 360 день після проведеного лікування до $(0,58 \pm 0,05) \times 10^9 / \text{л}$, що є нижче від прийнятої норми але на 19 % більше від вихідних даних.

На 360 день спостереження абсолютна кількість CD4+ становила $(0,39 \pm 0,04) \times 10^9 / \text{л}$, що на 55 % нижче норми, але на 23 % вище, ніж до ліку-

вання. Абсолютна кількість Т-супресорів CD8+ в порівнянні з показниками до трансплантації ЕКС збільшилась і дорівнювала $(0,22 \pm 0,03) \times 10^9 / \text{л}$, що на 57 % є нижчим за показники норми.

Важливу роль в патогенезі РА відіграє механізм гуморальної ланки імунітету, який представляють В-лімфоцити. Відносний вміст В-лімфоцитів до лікування знаходився в межах норми — $(9,99 \pm 1,01) \%$. Протягом всього періоду спостереження відносна кількість CD19 коливалась в межах норми. Абсолютна кількість В-лімфоцитів до лікування була нижчою норми на 28,6 % і становила $(0,15 \pm 0,02) \times 10^9 / \text{л}$. Через місяць після трансплантації та на 90 і 180 день спостереження абсолютний вміст лімфоцитів знизився і знаходився в майже однакових межах. На 30 день — $(0,08 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$, ($P < 0,0001$), на 90 день — $(0,09 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$, ($P < 0,01$) і на 180 — $(0,08 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$, ($P < 0,01$). На 270 та 360 день абсолютний вміст В-лімфоцитів був $(0,11 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$ та $(0,12 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$ відповідно, ($P < 0,05$), що було нижчим за вихідні дані на 27 % та 20 % відповідно.

Рівень активності НК-лімфоцитів є одним із показників важкості перебігу імунопатологічного процесу при РА. В досліджуваній групі пацієнтів ми виявили зменшення відносної кількості НК в порівнянні з показниками здорових людей в 1,7 разу та в 2,8 разу зменшення абсолютної кількості CD16. На 30 добу спостереження виявлено збільшення відносної кількості CD16, показник дорівнював $(15,74 \pm 2,30) \%$ ($P = 0,0001$). Через 90 днів спостерігається недостоєрне зниження відносної кількості НК до $(14,22 \pm 1,21) \%$ ($P = 0,31$). Через 180 днів відносний вміст CD16+ збільшується до $(15,21 \pm 1,54) \%$, значення достовірно ($P = 0,002$), але в порівнянні зі здоровими він в 1,25 раз менший, що може ще раз підтвердити зниження кілерної активності в хворих на РА. На 270 день показник відносного вмісту НК знижується до $(10,42 \pm 0,39) \%$ ($P = 0,04$), що на 1,43 % менше від початкового рівня (до лікування). На 360 день відбувається недостоєрне помірне збільшення НК до $(13,77 \pm 2,18) \%$ ($P = 0,13$).

Аналізуючи абсолютний вміст натуральних кілерів, цей показник знаходиться майже на одному і тому ж самому рівні. До лікування він дорівнював $(0,16 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$ і через 30 днів також $(0,16 \pm 0,02) \times 10^9 / \text{л}$ ($P = 0,001$). Через 90 днів — $(0,15 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$ ($P = 0,03$), через 180 — $(0,17 \pm 0,02) \times 10^9 / \text{л}$ ($P = 0,04$), через 270 — $(0,16 \pm 0,01) \times 10^9 / \text{л}$, значення недостоєрне ($P = 0,08$), через 360 днів — $(0,18 \pm 0,03) \times 10^9 / \text{л}$, значення недостоєрне ($P = 0,24$) (рисунок).

До лікування ФНП-альфа знаходився в межах $10,2 \pm 2,3$ пг/мл. Помітне зниження до $4,5 \pm 2,1$ пг/мл спостерігалось через місяць після введення СК. В усіх інших точках спостереження рівень ФНП-альфа незначно підвищився але був нижчим на 30–40 % від ви-



Рисунк

хідного рівня. Рівень прозапального цитокіну ІЛ-1 через місяць після введення СК стрімко знижується, а на 3 та 6 місяці спостереження він нижчий на 10–20 % від початкового рівня (отримані результати недостовірні). В обох групах пацієнтів в початковій точці дослідження виявлено підвищення рівня гамма-інтерферону (гамма-ІФ) в 7–8 разів від верхньої межі норми. Протягом періоду спостереження вміст його коливався і зменшився в обох групах — в контрольній до $135,2 \pm 12,4$ пг/мл, а в основній до $94,6 \pm 11,3$ пг/мл, хоча порівнюючи з межами норми 0–25 пг/мл концентрація ІФ-гамма залишалась підвищеною. При оцінці рівня ІЛ-8 виявлено його підвищений вміст в обох групах пацієнтів в 14–20 разів від межі норми 0–10 пг/мл. Проте в основній групі пацієнтів після введення СК вже через місяць відмічено різке зниження до $36,5 \pm 8,7$ пг/мл і в таких межах ІЛ-8 коливався до кінця періоду спостереження чого не відмічено в пацієнтів контрольної групи, в яких рівень ІЛ-8 продовжував залишатись на високо-

му рівні $143,6 \pm 28,4$ пг/мл. Помітне зростання вмісту ІЛ-10 в основній групі пацієнтів через 1 та 3 місяці після введення ЕКС, але до кінця періоду спостереження його значення наближається до вихідних показників.

Функціональний стан суглобів та кінцівок у цілому залежить від стадії та активності патологічного процесу, важкості й характеру деформацій, ступеня обмеження рухів у суглобах, прояву больового синдрому, кількості уражених суглобів та їх функціональної значимості, функціонального стану м'язів. Функціональні можливості хворих ми оцінювали за допомогою функціонального тесту Лі. Через 360 днів після проведеного лікування функціональні можливості хворих за тестом Лі, який характеризує здатність хворого виконувати дії, які зустрічаються в повсякденному житті, зросли на 31,33 % або на 6,5 бала.

Висновки

Трансплантація ЕКС хворим на РА має імунокоригуючий вплив і на клітинну і на гуморальну ланку імунітету. Після проведення трансплантації СК ембріонального походження відмічено зниження активності прозапальних цитокінів ФНО-альфа, ІЛ-1, гамма-ІФ та ІЛ-8, збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ-10. Покращення функціональних можливостей хворих свідчать про зменшення активності патологічного процесу, хоча чіткого кореляційного зв'язку між динамікою імунологічних параметрів та функціональних можливостей отримати не вдалося.

Література

1. Насонов Е. Л. Лечение ревматоидного артрита: современное состояние проблемы // РМЖ, 2006. — 14, № 8. — С. 573–577.
2. Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease/ed. by Richard K. Burt, Alberto M. Marmont. Landes Bioscience, 2004. — 489 p.
3. Смикодуб О.І., Демчук М.П. Спосіб лікування ревматоїдного артриту/Патент № 59678А Україна 15.09.2003.

Резюме

В лечении группы больных ревматоидным артритом использовались стволовые клетки эмбрионального происхождения. В результате наблюдения выявлено их иммунокорректирующее влияние на клеточное и гуморальное звено иммунитета, снижение активности провоспалительных цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-1, гамма-ИФ и ИЛ-8, увеличение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10, улучшение функциональных возможностей.

Summary

For treatment of rheumatoid arthritis patients group were used embryonic stem cells. The follow-up showed their immunoregulatory impact on the cellular and humoral component of the immune system, decrease of the antiinflammatory cytokines TNF- α , IL-1, γ -IF and IL-8 activity, increase of the antiinflammatory cytokine IL-10 level, improvement of the functional abilities.