

# ВПЛИВ ЛІКУВАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ СУСПЕНЗІЯМИ НА ДИНАМІКУ ВМІСТУ НАТУРАЛЬНИХ КІЛЕРІВ В ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

М.П. Демчук, О.І. Смикодуб

Національний медичний університет ім. акад. О.О. Богомольця, Київ

## Резюме

У статті коротко наведено значення натуральних кілерів у разі ревматоїдного артриту, зниження їх функціональної активності при системних проявах та високій активності запального процесу. Показано позитивний вплив трансплантації кріоконсервованих ембріональних клітинних суспензій на уміст абсолютної та відносної кількості натуральних кілерів у периферійній крові хворих на ревматоїдний артрит і відмічено зниження активності патологічного процесу.

**Ключові слова:** ревматичний артрит, кріоконсервовані ембріональні клітини, трансплантація.

Натуральні кілери (НК) — це лімфоцити, які здійснюють натуральну клітинно-опосередковану цитотоксичність. Вони належать до особливої, власної популяції, яка формується у філо- та онтогенезі на відміну від Т- та В-лімфоцитів і макрофагів.

Активність НК під час ревматоїдного артриту (РА) зазнає неоднозначних змін. Так, у периферійній крові рівень НК різко знижений. Функціональна активність НК синовіальної рідини, навпаки практично не змінена, що може бути пов'язано з утягненням у цитоліз "аномальних" НК, які продукуються в синовіальній рідині в разі РА і лізують широкий спектр лімфобластоїдних клітин людини. Пригнічення натуральної кілерної активності в разі РА, можливо, пов'язане з утворенням антитіл до кілерних лімфоцитів, блокуванням їх мембрани імунними комплексами. Існують також дані про пригнічувальну дію на активність НК-клітин глюкокортикоїдних та статевих гормонів, про недостатню функцію інтерлейкінів, які здійснюють стимуляцію кілерних лімфоцитів [2,4].

У багатьох хворих на РА виявлена відповідність між важкістю клінічних проявів захворювання, зниженою активністю кілерних клітин та вираженістю інших імунопатологічних змін (зниження кількості Т-лімфоцитів, збільшення "null"-клітин, В-лімфоцитів, ЦИК та ін.). За даними Н.Ф. Сороки, В.Е. Ягур у хворих на РА з високою активністю та системними проявами рівень активності кілерних лімфоцитів знижується в 4–5 раз, що вимагає проведення більш інтенсивної фармакотерапії [2].

*Метою* нашої роботи було дослідити вплив лікування ембріональними клітинними суспензіями на кількість НК-клітин (CD16) у хворих на РА.

До групи дослідження були включені хворі з установленим, відповідно до діагностичних критеріїв, діагнозом РА. Першу основну групу склали 26 хворих на серопозитивний РА. З них 4 чоловіків та 22 жінки віком від 27 до 64 років. В 4 осіб виявлено I ст. активності, II ст. активності мали 16 пацієнтів, III ст. активності — 6. Швидкопрогресуючий перебіг спостерігався в 10 осіб, у решти — повільнопрогресуючий. Функціональна недостатність суглобів (ФНС)

I ст. не було виявлено, II ст. — у 16 хворих (61,54%), III ст. — у 10 (38,46%).

Контрольну групу склали 24 хворих з установленим діагнозом РА, схожих за віком, однієї статі, тривалістю захворювання, основними клініко-лабораторними проявами захворювання, ФНС.

Пацієнтам обох груп проводили загальноприйняте лікування: прийом індивідуально підбраного препарату з групи нестероїдних протизапальних засобів, прийом глюкокортикостероїдів у підтримувальній дозі 5–15 мг, хворобомодифікувальні препарати, а саме метотрексат — 7,5 мг на добу 1 раз на 1 тиж, далагін — 100 мг на добу, сульфасалазин — до 2 г на добу, а також місцеве застосування протизапальних препаратів у вигляді мазей, компресів, ЛФК. До основної групи ввійшли пацієнти, які протягом 8–12 тиж приймали хворобомодифікувальні препарати, але досягти позитивного терапевтичного ефекту не вдалося. Решта пацієнтів (контрольна група), у яких під час прийому хворобомодифікувальних препаратів спостерігалось клініко-лабораторне покращення загального стану, продовжувала приймати ці препарати в попередніх дозах. У пацієнтів основної групи із загальноприйнятого лікування було виключено хворобомодифікувальні препарати і через 3–4 тиж проведено трансплантацію ембріональних клітинних суспензій, що містять стовбурові клітини.

Для трансплантації були використані кріоконсервовані ембріональні клітинні суспензії, виготовлені з ембріонів 4–8 тиж гестації. Безпосередньо перед трансфузією контейнери з клітинними суспензіями виймали з рідкого азоту, занурювали у водяну баню за температури 40°C і витримували до появи рідкої фази. Подальші маніпуляції проводили за кімнатної температури, суворо дотримуючи правил асептики. Після внутрішньовенної премедикації — 10 мг димедролу і 25 мг преднізолону, через систему для переливання крові на фоні фізіологічного розчину вводили ембріональну клітинну суспензію в об'ємі 0,3–3 мл з кількістю ядровміщувальних клітин  $0,1 \times 10^8$ – $4,0 \times 10^8$  і вмістом КУО-ГМ  $0,6 \times 10^5$ – $1,5 \times 10^5$  в даному об'ємі. Швидкість уведення — 20–40 крапель за хвилину [1,3].

Таблиця 1

Зміна активності запального процесу у хворих на ревматоїдний артрит під впливом лікування ембріональними клітинами суспензіями

Показники активності патологічного процесу	До лікування	Після лікування					
		15 діб	30 діб	3 міс	6 міс	9 міс	12 міс
N=26		Оцінка в балах					
Ранкова скованість	3	3	2	1	1	1	1
Гіпертермія	2	2	2	1	0	0	0
Синовіт	2	1	0	0	0	0	0
ШОЕ, мм/год	2	2	2	1	1	0	0
C-реактивний білок	3	2	2	1	1	0	0
α-2-глобуліни, %	2	2	2	2	2	2	2
Сума	14	12	10	6	5	3	3

Примітка: I — мінімальна (1–6 балів), II — середня (7–12 балів), III — висока (13–18 балів), відсутність активності — 0 балів.

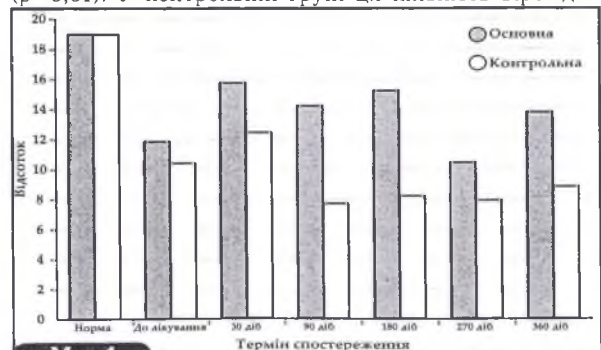
В усіх пацієнтів протягом першої доби після трансплантації спостерігався синдром раннього пост-трансплантаційного покращання, який виявлявся зменшенням загальної слабкості, збільшенням фізичної та розумової активності, зменшенням тривалості ранкової скованості, покращанням сну та апетиту.

Показник CD16 досліджували в обох групах хворих. Для визначення кількості НК ми використали методику дослідження субпопуляційного складу лімфоцитів периферійної крові людей на проточному лазерному цитофлуориметрі FACStar plus, фірми Becton Dickinson (США) за допомогою моноклональних антитіл CD16 (фірма "Сорбент" Росія).

До статистичного аналізу включали показники відносної та абсолютної кількості НК, які були отримані перед проведенням трансплантації, на 30 день, а потім кожних наступних 3 міс після проведеного лікування. Отримані дані піддавали варіаційному статистичному аналізу з використанням непараметричного критерію Вілкоксона. Обчислення проводили за допомогою програми Statistica на комп'ютері IBM PC.

**Результати та їх обговорення**

Під час обстеження 50 хворих на РА нам вдалося виявити зменшення відносної кількості НК порівнянно з показниками здорових людей в 1,7 разу та зменшення абсолютної кількості CD16 у 2,8 разу. На 30 добу спостерігали збільшення відносної кількості CD16. В основній групі цей показник дорівнював (15,74±2,30)%, значення достовірне (p=0,0001\*), а в контрольній — (12,44±1,65)%, значення недостовірне (p=0,09). Через 90 діб в основній групі спостерігали недостовірне зниження кількості НК до (14,22±1,21)% (p=0,31). У контрольній групі ця кількість вірогідно



Мал. 1 Динаміка відносного вмісту НК-клітин у хворих на ревматоїдний артрит під впливом трансплантації ембріональних клітинних суспензій

знижується до (7,7±0,69)% (p=0,001\*). Через 180 діб після трансплантації в основній групі пацієнтів CD16 збільшується до (15,21±1,54)% (p=0,002\*), але порівняно із здоровими цей показник в 1,25 разу менший, що може ще раз підтвердити зниження кілерної активності у хворих на РА. У контрольній групі відносний уміст натуральних кілерів на 180-й день вірогідно збільшився до (8,2±0,81)% (p=0,003\*). На 270 та 360 добу кількість НК у хворих, які ввійшли до контрольної групи була майже в тих самих межах і дорівнювала (7,9±1,03)% (p=0,001\*) та (8,8±0,81)% (p=0,003\*) відповідно. В основній групі пацієнтів на 270 добу показник відносного вмісту НК знижується до (10,42±0,39)% (p=0,04\*), що на 1,43% менше від початкового рівня (до лікування). На 360 добу відбувається недостовірне помірне збільшення НК до (13,77±2,18)% (p=0,13) (мал. 1).

Аналізуючи абсолютний уміст натуральних кілерів, в основній групі цей показник був на 58,6% нижчий, ніж у групі здорових людей, і знаходився майже на одному і тому ж самому рівні протягом періоду спостереження. До лікування він становив (0,16±0,01)×10<sup>9</sup>/л і через 30 діб також (0,16±0,02)×10<sup>9</sup>/л (p=0,001\*). Через 90 діб — (0,15±0,01)×10<sup>9</sup>/л (p=0,03\*), через 180 — (0,17±0,02)×10<sup>9</sup>/л (p=0,04\*), через 270 — (0,16±0,01)×10<sup>9</sup>/л (p=0,08, значення недостовірне), через 360 діб — (0,18±0,03)×10<sup>9</sup>/л (p=0,24, значення недостовірне). У контрольній групі вихідні дані абсолютного вмісту CD16 дорівнювали (0,12±0,01). Через 30 діб від початку спостереження вміст НК збільшився в 1,58 разу і дорівнював (0,19±0,02)×10<sup>9</sup>/л (p=0,04\*). Проте на 90 і 180 добу спостерігали різке зниження вмісту НК і він дорівнював (0,07±0,01)×10<sup>9</sup>/л (p=0,004\*) та (0,09±0,01)×10<sup>9</sup>/л (p=0,42) відповідно. На 270 добу кількість НК достовірно підвищилася до (0,10±0,02)×10<sup>9</sup>/л (p=0,002\*) та на 360 добу він дорівнював (0,11±0,08)×10<sup>9</sup>/л (p=0,002). Всі отримані дані в контрольній групі пацієнтів були нижчими в початковій точці відліку на 58,97%, порівняно з такими показниками в здорових людей і до кінця терміну спостереження, на 360 добу, абсолютний уміст натуральних кілерів зменшився ще на 71,79% від їх вмісту в здорових людей.

З отриманих результатів випливає, що в групі хворих, яким була проведена трансплантація ембріональних клітинних суспензій рівень відносного вмісту НК має здатність підвищуватися, що не спостерігається в контрольній групі. Також в основній групі на тлі проведеної терапії не спостерігається зниження

абсолютного вмісту НК, яке має місце в контрольній групі хворих.

Спостерігаючи за основними показниками активності патологічного процесу, в основній групі пацієнтів (табл. 1) можна відмітити поступове зниження активності РА.

Отже, проведення трансплантації клітинних суспензій ембріонального походження дає можливість

підвищити вміст відносної кількості НК у периферійній крові хворих на РА, а також забезпечити стабільний уміст абсолютної кількості НК, знижуючи одночасно активність запального процесу. Таким чином, трансплантація ембріональних клітинних суспензій має вплив на одну із ланок складного імунopatологічного механізму в разі РА, а саме вплив на функціональну активність натуральних кілерів у периферійній крові.

### Література

- [1] Демчук М.П., Смикодуб А.І. Анемічний синдром при ревматоїдному артриті та його корекція трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин ембріональної печінки людини//Лікарська справа.– 2002.– N2.– С.59–63.  
 [2] Сорока Н.Ф., Ягур В.Е. Ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения.– Минск, 2000.– 190с.  
 [3] Smikodub A., Demchuk M. Application of Hematopoietic Embryonic Stem Cells in Treatment of Patients with

Rheumatoid Arthritis//International Conference II Hematopoietic Stem Cells Research and Clinical Applications.– 13–15 February 2003.– Paris, France.

- [4] Yanagihara Y., Shiozawa K., Takai M., Kyogoku M., Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA)//Clin Exp Immunol.– 1999.– V.118.– N1.– С.131–136.

### Резюме

В статье кратко приведено значение натуральных киллеров при ревматоидном артрите, снижение их функциональной активности при системных проявлениях и высокой активности воспалительного процесса. Показано положительное влияние трансплантации криоконсервированных эмбриональных клеточных суспензий на абсолютное и относительное содержание натуральных киллеров в периферической крови больных ревматоидным артритом и отмечено снижение активности патологического процесса.

### Summary

This article provides shorts outline of natural killer count in rheumatoid arthritis, their decreased functional activity in cases with systemic manifestations and highly active inflammatory process. Described is positive effect of transplantation of cryopreserved embryonic cell suspensions in absolute and relative natural killer count in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients, as well as decreased activity of pathological process.