

DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2021.4.92>

*И. И. Саванович¹, Я. И. Исайкина², О. В. Алейникова²,
Г. В. Леус³, А. В. Сикорский¹, И. В. Мазаник³*

АЛЛОГЕННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ КРОНА: АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь¹*

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии, Беларусь,²*

УЗ «3-я городская детская клиническая больница» г. Минска, Беларусь³

Актуальной проблемой при лечении болезни Крона у детей является потеря чувствительности или отсутствие ответа на назначаемую противовоспалительную терапию, что проявляется рецидивом или увеличением степени активности заболевания. Данная терапия включает глюкокортикостероиды, иммунодепрессанты, салицилаты, генно-инженерные биологические препараты, продукты для энтерального питания. В этой связи разрабатываются новые способы лечения, одним из которых является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В мире имеется опыт по применению мезенхимальных стволовых клеток у взрослых пациентов с болезнью Крона. Клинические исследования по применению МСК у детей с ВЗК находятся на этапе становления. В статье описан клинический случай использования МСК у пациента детского возраста с болезнью Крона. Он демонстрирует краткосрочную клиническую эффективность системного введения аллогенных МСК у пациента с болезнью Крона в качестве комбинированного лечения со стандартной терапией. Результаты исследования подтверждают, что применение МСК с их мощным иммуносупрессивным, противовоспалительным и регенеративным потенциалом может быть одной из составляющих комплексной терапии ВЗК у детей.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, дети, мезенхимальные стволовые клетки.

*I. I. Savanovich, Ya. I. Isaykina, O. V. Aleinikova, G. V. Leus,
A. V. Sikorsky, I. V. Mazanik*

ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF CROHN'S DISEASE: A CASE STUDY

An urgent problem in the treatment of Crohn's disease in children is a loss of sensitivity or lack of response to prescribed anti-inflammatory therapy, which is manifested by a relapse or an increase in the degree of disease activity. This therapy includes glucocorticosteroids, immunosuppressants, salicylates, genetically engineered biological drugs, and enteral nutrition products. In this regard, new methods of treatment are being developed, one of which is the use of mesenchymal stem cells (MSC). There is experience in the world on the use of mesenchymal stem cells (MSCs) in adult patients with inflammatory bowel diseases (IBD). Clinical studies on the use of MSCs in children with IBD are in their infancy. The article describes a clinical case demonstrating the effectiveness of MSC administration in a patient with Crohn's disease. It demonstrates the short-term clinical efficacy of systemic administration of allogeneic MSCs in a patient with Crohn's disease as a combination treatment with standard therapy. The results of the study confirm that the use of MSCs with their powerful immunosuppressive, anti-inflammatory and regenerative potential can be one of the components of complex therapy for IBD in children.

Key words: inflammatory bowel disease, Crohn's disease, children, mesenchymal stem cells.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) у детей, к которым относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), представляют серьезную медико-социальную проблему в современной детской гастроэнтерологии [5, 6]. Цель терапии ВЗК – достижение и удержание длительной бесстероидной ремиссии, что включает заживление зон поражения, остановку прогрессирования заболевания и осложнений, минимизацию риска хирургического вмешательства и своевременное его выполнение при наличии показаний. Выбор объема лечения определяется возрастом, длительностью заболевания, протяженностью поражения, наличием внекишечных проявлений, эффективностью ранее проводившейся терапии, риском развития осложнений, согласием пациента и/или его законных представителей на планируемый объем терапии, комплаентностью и другими факторами [5, 6]. Для лечения используются глюкокортикостероиды (ГКС), продукты для энтерального питания, иммунодепрессанты, салицилаты, генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), антибактериальные, антимикотические, противовирусные и другие лекарственные средства [5, 6].

Углубление понимания иммунопатологического процесса при ВЗК изменило парадигму их лечения, которая заключается не только в контроле симптомов и улучшении качества жизни, но и контроле за структурными повреждениями кишечника [7].

Однако было показано, что частота достижения клинической ремиссии при лечении ГКС продолжительностью от 8 до 12 недель у детей составляет от 57 % до 79 %, а клинический ответ не коррелирует с эндоскопическим улучшением [6]. Внедрение генно-инженерных биологических препаратов в схему лечения ВЗК значительно увеличило долю пациентов, достигающих стабильной ремиссии в короткие сроки [6]. Тем не менее у 30 % пациентов не удается добиться снижения активности заболевания на фоне применения блокаторов TNF- α . Актуальной проблемой при лечении ГИБП является потеря чувствительности/ответа, что проявляется рецидивом или увеличением степени активности заболевания [6]. В этой связи во всем мире идет поиск терапевтического воздействия на новые патологические мишени. К ним относится дисфункция эпителиального барьера, стромальные клетки, кишечные эпителиальные клетки и другие [1].

Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области клеточной биологии стало возможным разрабатывать новые способы лечения, одним из которых является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладающих иммуносупрессирующими свойствами [1, 2]. В мире имеется опыт по применению МСК у взрослых пациентов с ВЗК, но клинические исследования по применению МСК у детей с ВЗК находятся на этапе становления [2, 3]. В США прохо-

дит 1 фаза клинического испытания NCT 02150551 по изучению безопасности и переносимости применения аллогенных МСК для лечения пациентов детского возраста с ВЗК. Препарат МСК вводится еженедельно в дозе $> 1 \times 10^6$ /кг в течение 4 недель [4]. Первое аналогичное клиническое испытание эффективности использования аллогенных МСК проводится в Беларуси в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ) [1].

Приводим собственный клинический опыт использования введения МСК у пациента детского возраста с БК.

Цель данной работы – оценить краткосрочную эффективность системного введения аллогенных МСК у пациента с БК.

Материал и методы

Объектом исследования был пациент N., 17 лет, проходящий лечение в УЗ «3-я городская детская клиническая больница» г. Минска и РНПЦ ДОГИ.

Пациент N. впервые поступил в гастроэнтерологическое отделение в возрасте 16 лет с жалобами на боли в животе без четкой локализации, слабость, жидкий стул с примесью слизи и крови, афтозный стоматит, снижение уровня гемоглобина. Данные жалобы стали беспокоить в течение последних месяцев, в анамнезе заболевания – безуспешное неоднократное хирургическое и консервативное лечение анальных трещин в течение 2 лет.

Проведен комплекс клинко-лабораторно-инструментальных исследований. Для визуализации патологического процесса выполнены колоноилеоскопия и эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) с биопсией; лучевая диагностика – УЗИ органов брюшной полости, трансабдоминальное УЗИ кишечника, МРТ и КТ брюшной полости, малого таза, забрюшинного пространства.

С учетом клинических и лабораторных проявлений рассчитывался педиатрический индекс активности болезни Крона (ПИАБК) [6].

Результаты и обсуждение

По данным первичных ЭГДС и илеоколоноскопии выявлены изъязвления в пищеводе с фибринозно-некротическим дном до 3–5 мм, окруженные визуально не пораженной слизистой, слизистая желудка очагово рыхлая и умеренно гиперемирована в препилорическом отделе, пилорус проходим; луковица двенадцатиперстной кишки (ЛДПК) обычной формы и размеров, слизистая гиперемирована с наличием эрозий с налетом фибрина, просвет ДПК обычный, слизистая без выраженных изменений, очагов поражения на осмотренном участке начальных отделов тонкой кишки не обнаружено.

При проведении илеоколоноскопии кишечник осмотрен до купола слепой кишки и около 20–25 см

дистальных отделов тонкой кишки. В тонкой кишке слизистая с наличием эрозий и изъязвлений, чередующихся с относительно «нормальной» картиной; илеоцекальный переход – рыхлый, эрозирован; наличие эрозий отмечается в нижней трети восходящей кишки; восходящая, поперечноободочная, нисходящая кишка визуально не поражены; в сигмовидной кишке – очаги эрозирования чередуются с непораженной слизистой. При морфобиопсии из верхних отделов выявлен эрозивно-язвенный эзофагит, активный, с наличием грануляционной ткани и гнойно-некротического детрита; в биоптатах слизистой двенадцатиперстной кишки фрагменты нормального строения сочетаются с участками с выраженной атрофией, наличием эпителиоидноклеточных гранул, количество межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ) не увеличено. В биоптатах слизистой желудка в антральном отделе степень активности воспаления и лимфоидная инфильтрация выраженные. При морфобиопсии, полученной при проведении илеоколоноскопии, в биоптатах тонкой кишки выявлена субтотальная атрофия с очаговой и диффузной выраженной трансмукозальной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией, с неравномерной примесью эозинофилов и нейтрофилов, проникающих в покровный и эпителий крипт, очаговые эрозивно-язвенные дефекты СО с разрастанием в собственной пластинке грануляционной ткани и наличием в ней нечетких эпителиоидноклеточных гранул. В биоптатах из толстой кишки участки с нормальным строением чередуются с участками с трансмукозальной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией собственной пластинки, эрозивно-язвенными дефектами и грануляциями и «крипт-абсцессами», наличием гигантских многоядерных клеток.

Пациентке выставлен клинический диагноз – болезнь Крона, возраст верификации – А1в, локализация процесса L3+L4 (илеоколит + поражение верхних отделов ЖКТ), с перианальным поражением (множественные анальные трещины, состояние после лазерной вапоризации анальной трещины), без нарушений роста, атака 1, высокой степени активности. Эрозивно-язвенный эзофагит, смешанного генеза. Белково-энергетическая недостаточность 1 степени, анемия 1 степени. ПИАБК составлял 35 баллов.

С целью индукции ремиссии назначена иммуносупрессивная терапия (метилпреднизолон перорально, месакол и иммуносупрессор – азатиоприн), симптоматическое лечение (антибактериальная терапия, ингибиторы протонной помпы, ферротерапия). Отмечено клиническое улучшение, в течение 6 недель индекс педиатрической активности болезни Крона снизился до 15 баллов. Длительность приема ГКС с полной дозой с постепенной отменой составила 13 недель.

Через 5 месяцев от начала лечения, несмотря на поддерживающую терапию азатиоприном в дозе 2,5 мг/кг, пациентка вновь госпитализируется с жалобами на слабость, субфебрилитет, жидкий стул с при-

месью слизи. При лабораторном обследовании – повышение уровня острофазовых реактантов, в общем анализе крови – снижение уровня гемоглобина. По данным контрольной ЭГДС и илеоколоноскопии выявлена отрицательная динамика – наличие эрозий в теле желудка, там же по результатам морфобиопсии – картина изменений, характерная для болезни Крона. Повторно был назначен преднизолон, антибактериальная терапия, препараты железа парентерально, продолжен прием азатиоприна.

С учетом характера течения, объема поражения с пациенткой и законным представителем была обсуждена терапия аллогенными МСК и получено согласие.

Биомедицинский клеточный продукт (БМКП) МСК получали из костного мозга здорового донора в возрасте старше 18 лет, обследованного в соответствии с Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Об установлении перечня заболеваний и состояний, при которых сдача крови и ее компонентов противопоказана», «Инструкции о порядке медицинского осмотра доноров крови и ее компонентов», «Инструкции о порядке учета доноров крови и ее компонентов» от 19 мая 2011 г. № 37. Донор имел отрицательные результаты анализов на HIV, HTLV, HCV, HBV и сифилис. Костный мозг в объеме 60–80 мл забирали посредством костномозговой пункции под анестезией. Мононуклеарные клетки выделяли на Гистопаке плотностью 1,077 (Sigma, США), дважды отмывали в 0,9 % растворе NaCl, ресуспендировали в IMDM с 10 % ЭТС (Sigma, США) и переносили в концентрации $2-3 \times 10^6$ /мл во флакон объемом 175 см² (Sarstedt, Германия). Клетки инкубировали при 37° в 5 % CO₂. При 80–90 % покрытии поверхности флакона прикрепленными клетками их дезаггезировали при помощи 0,25 % трипсин-ЭДТА (Sigma, США) и пересаживали в новые культуральные флаконы 175 см² (I-й пассаж). Таким образом, производили 2–3 пассажа для получения эффективного БМКП МСК, содержащего клеток не менее 3×10^6 /кг веса пациента. Отбирали МСК в количестве не менее 2×10^6 /кг для 1-го введения. Клетки были идентифицированы на проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров CD90, CD105, CD73, характерных для МСК. Обязательным требованием являлось исследование БМКП на стерильность по всему спектру бактериальной и вирусной контаминации. Оставшиеся МСК культивировали 2 недели до введения пациенту (2-е введение). Перед введением БМКП МСК обрабатывали и тестировали как описано ранее.

Иммунофенотипический анализ МСК: для подтверждения принадлежности полученных клеток к МСК использовали набор MSC Phenotyping Kit, human (Miltenyi Biotec, Германия), включающий коктейль меченных флуорохромами антител к CD73, CD90, CD105, по которым МСК позитивны, и антител к CD14, CD45, CD34, которые характерны для гемопоэтических кле-

ток, но отсутствуют на МСК. В набор входит также коктель для изотипического контроля. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) в программе CellQuestPro. Для каждого образца анализировали не менее 10 тыс. клеток. Оценка жизнеспособности клеток (ЖСП): жизнеспособность клеток определяли добавлением к 20 мкл клеточной суспензии 20 мкл трипанового синего, инкубацией клеток с красителем в течение 5 минут и последующим подсчетом количества живых клеток (не окрашенных) и мертвых (окрашенных) в гемоцитометре под световым микроскопом. Общее количество подсчитанных клеток – не менее 100. Микробиологический контроль стерильности БМКП МСК проводился согласно методическим рекомендациям «Инструкция по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, консервированного костного мозга, кровезаменителей и консервирующих растворов» (МЗ РФ 29.05.1995 года), руководству пользователя автоматического гемакультиватора закрытого типа «BACTEC 9120» (Becton Dickinson, США), инструкциями по применению коммерческих гемафлаконов с жидкими питательными средами и флюорогенным материалом для выделения аэробной микрофлоры (BACTEC PEDS PLUS/F Culture Vials) и грибов (BACTEC Mycosis-IC/F Culture Vials).

Введение аллогенных МСК пациенту: для введения применялся МСК с отрицательными показателями по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации. Отмытые дважды в физиологическом растворе клетки разводили в 20 мл физиологического раствора. Суспензию МСК вводили пациенту внутривенно в течение 10–20 минут под контролем врача двукратно с интервалом 2 недели.

Выполнено 2 введения биомедицинского клеточно-продукта (БМКП) МСК внутривенно в дозе $2,5 \times 10^6$ /кг и $2,75 \times 10^6$ /кг на фоне стандартной иммуносупрессивной терапии, включающей преднизолон с постепенной отменой и азатиоприн.

Через 12 недель проведено контрольное клиническое и лабораторно-инструментальное обследование, пациент получал азатиоприн в качестве поддерживающей терапии. ПИАБК составил менее 10 баллов. По данным ЭГДС, пищевод свободно проходим, кардия смыкается не полностью, слизистая розовая; желудок воздухом расправляется, просвет достаточный, содержимое обычное, складки продольные, извитые, перистальтика прослеживается во всех отделах, слизистая антрального отдела незначительно гиперемирована; пилорус округлый, проходим, луковица ДПК и постбульбарный отдел – без видимой патологии. По данным илеоколоноскопии, эндоскоп свободно проведен до купола слепой кишки, заинтубирована баугиниева заслонка, осмотрен терминальный отдел подвздошной кишки, слизистая его розовая, незначительно гиперемирована, единичные мелкоточечные эрозии, на ниж-

ней губе баугиневой заслонки имеется 2 псевдополипы; прямая и сигмоидная кишка и расправляется, слизистая розовая, гаустация выражена, восходящий отдел не изменен, селезеночный угол острый проходим, поперечноободочная кишка в форме равнобедренного треугольника, складки выражены, печеночный изгиб проходим, складки в восходящем отделе выражены, тонус не изменен; слизистая во всех отделах розовая, блестящая, перистальтика не нарушена. По данным морфобиопсии верхних отделов ЖКТ, хронический фокально акцентуированный антральный гастрит и фундальный гастрит: лимфоидная инфильтрация от слабой до умеренной, активность умеренная, Н. Рупорги отсутствует. Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки – один фрагмент нормального строения, один фрагмент с атрофией ворсинок, количество МЭЛ не повышено. По данным морфобиопсии нижних отделов, фрагменты слизистой оболочки тонкой кишки с очаговой лимфоплазмозитарной инфильтрацией, наличием гигантских многоядерных клеток, небольшим количеством эозинофилов, слизистая оболочка баугиниевой заслонки с умеренной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией, слизистая оболочка толстой кишки – участки нормальной структуры чередуются с участками с очаговой лимфоплазмозитарной воспалительной инфильтрацией, гигантскими многоядерными клетками, с панетклеточной метаплазией в базальных отделах крипт, наличием эпителиоидных клеток.

Результаты проведенных контрольных обследований позволили сделать заключение, что на фоне проведенной терапии МСК в комбинации со стандартной терапией отмечена клиническая ремиссия (педиатрический индекс активности болезни Крона менее 10 баллов) и заживление зон поражения слизистой пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, заживление слизистой толстой кишки и становление эндоскопической ремиссии в терминальном отделе подвздошной кишки.

Таким образом, данный клинический случай демонстрирует краткосрочную клиническую эффективность системного введения аллогенных МСК у пациента с болезнью Крона в качестве комбинированного лечения со стандартной терапией. Результаты клинического исследования подтверждают, что применение МСК с их мощным иммуносупрессивным, противовоспалительным и регенеративным потенциалом может быть одной из составляющих комплексной терапии ВЗК.

Литературы

1. Исайкина, Я. И. Перспективы использования мезенхимальных стволовых клеток в терапии воспалительных заболеваний кишечника / Я. И. Исайкина, И. И. Саванович, А. В. Сикорский // Мед. журн. – 2020. – № 3. – С. 4–11.
2. Князев, О. В. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на модели язвенного колита / О. В. Князев, С. Г. Хомерики, И. Е. Трубицына, А. Г. Конопляни-

ков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 144(8). – С. 62–66.

3. *Barnhoorn, M. C. Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / M. C. Barnhoorn, S. K. Hakuno, R. S. Bruckner [et al.] // Journal of Crohn's and Colitis. – 2020. – P. 1–15. – doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa009.*

4. *Children's National Medical Center Washington, District of Columbia, United States Safety and Tolerability Of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Pediatric Inflammatory Bowel Disease // Clinical Trials. gov., NCT 02150551.*

5. *Mamula, P. Pediatric Inflammatory Bowel Disease / P. Mamula, A. B. Grossman, R. N. Baldassano [et al.]. – Third Edition: Springer, 2017. – P. 754.*

6. *Ruemmele, F. M. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease / F. M. Ruemmele, G. Veres, K. L. Kolho [et al.] // J. Crohns Colitis. – 2014. – Vol. 8, № 10. – P. 1179–1207.*

7. *Turner, D., Ricciuto A., Lewis A. et al. An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. Gastroenterology. – 2021. – № 160(5). – P. 1570–1583.*

References

1. *Isajkina, Ya. I. Perspektivy ispol'zovaniya mezenhimal'nyh stvolovyh kletok v terapii vospalitel'nyh zabolevanij kishechnika / Ya. I. Isajkina, I. I. Savanovich, A. V. Sikorskij // Med. zhurn. – 2020. – № 3. – S. 4–11.*

2. *Knyazev, O. V. Transplantaciya mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok kostnogo mozga na modeli yazvennogo kolita / O. V. Knyazev, S. G. Homeriki, I. E. Trubicyna, A. G. Konoplyannikov // Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. – 2017. – № 144(8). – С. 62–66.*

3. *Barnhoorn, M. C. Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / M. C. Barnhoorn, S. K. Hakuno, R. S. Bruckner [et al.] // Journal of Crohn's and Colitis. – 2020. – P. 1–15. – doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa009.*

4. *Children's National Medical Center Washington, District of Columbia, United States Safety and Tolerability Of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Pediatric Inflammatory Bowel Disease // Clinical Trials. gov., NCT 02150551.*

5. *Mamula, P. Pediatric Inflammatory Bowel Disease / P. Mamula, A. B. Grossman, R. N. Baldassano [et al.]. – Third Edition: Springer, 2017. – P. 754.*

6. *Ruemmele, F. M. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease / F. M. Ruemmele, G. Veres, K. L. Kolho [et al.] // J. Crohns Colitis. – 2014. – Vol. 8, № 10. – P. 1179–1207.*

7. *Turner, D., Ricciuto A., Lewis A. et al. An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. Gastroenterology. – 2021. – № 160(5). – P. 1570–1583.*

Поступила 20.08.2021 г.