DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.3.009>
УДК 616.36-089.843:576.343]-097

Коротков С.В.¹, Носик А.В.¹, Примакова Е.А.¹, Петровская Е.Г.¹, Назарова Е.А.¹, Дедюля Н.И.¹,
Ефимов Д.Ю.¹, Пикиреня И.И.², Щерба А.Е.¹, Кривенко С.И.¹, Руммо О.О.¹

¹ Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,
Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Korotkov S.¹, Nosik A.¹, Primakova E.¹, Petrovskaya E.¹, Nazarova E.¹, Dyadyulya N.¹, Efimov D.¹,
Pikirenaya I.², Shcherba A.¹, Krivenko S.¹, Rummo O.¹

¹ Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Обоснование места клеточных технологий в протоколе иммуносупрессии при трансплантации печени

Inclusion of Cell Technologies in the Protocol of Immunosuppression in Liver Transplantation

Резюме

Современная иммуносупрессивная терапия обеспечивает хорошую долгосрочную выживаемость трансплантатов печени и пациентов после операции. Тем не менее, прием иммуносупрессантов сопряжен с развитием побочных эффектов – почечного повреждения, метаболического синдрома, инфекционных осложнений и повышения риска развития онкологических заболеваний. Альтернативой стандартной иммуносупрессивной терапии являются клеточные биотехнологии, позволяющие замещать иммуносупрессивный эффект протокольной иммуносупрессии без риска развития отторжения. В данной публикации продемонстрированы основные результаты экспериментальных и клинических исследований по изучению применения мезенхимальных стволовых клеток в трансплантации солидных органов. Применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на базе Минского научно-практического центра хирургии, трансплантологии и гематологии у пациентов после трансплантации печени с острым почечным повреждением позволило редуцировать дозу базового иммуносупрессанта такролимуса без риска развития отторжения и способствовало быстрому восстановлению почечной функции. На основании проведенного анализа сделаны выводы о целесообразности разработки методов лечения пациентов после органных трансплантаций.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, иммуносупрессивная терапия, трансплантация солидных органов, осложнения иммуносупрессии, острое почечное повреждение.

Abstract

Modern immunosuppressive therapy provides good long-term survival of liver transplants and patients after surgery. Nevertheless, immunosuppression is associated with development of adverse effects – kidney injury, metabolic syndrome, infectious complications, and increase of the risk of cancer. Cell biotechnologies are an alternative to the standard immunosuppressive therapy, which lets to replace the immunosuppressive effect of protocol immunosuppression without the risk of

rejection. This publication demonstrates the main results of experimental and clinical studies of application of mesenchymal stem cells in solid organ transplantation. Application of mesenchymal stem cells of adipose tissue at the Minsk Scientific-Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology in patients after liver transplantation with acute kidney injury allowed to reduce the dose of the basic immunosuppressant tacrolimus without the risk of rejection and promoted rapid renal function recovery. On the base of analysis, the conclusions were made about the advisability of development of the methods for treatment of patients after organ transplantation with MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells, immunosuppressive therapy, solid organ transplantation, complications of immunosuppression, acute kidney injury.

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время трансплантация печени (ТП) является единственным эффективным методом лечения пациентов с диффузными и очаговыми поражениями печени в терминальных стадиях болезни.

Согласно современным данным, пятилетняя выживаемость пациентов после трансплантации печени от доноров со смертью мозга составляет 75% [1], а 10-летняя – 70% [2].

Одним из факторов, обеспечивающих длительную выживаемость пациентов после пересадки, является иммуносупрессивная терапия (ИСТ). Различные схемы ИСТ позволяют минимизировать риски развития острого и хронического отторжения в трансплантате, частота которых в различные сроки после трансплантации составляет 25–46% [3] и 3–5% [2, 4] соответственно.

Тем не менее длительный прием иммуносупрессантов (ИС) сопряжен с развитием ряда побочных эффектов (табл. 1).

Таблица 1

Осложнения иммуносупрессивной терапии после трансплантации печени

Вид осложнения	Частота
Нефротоксичность ингибиторов кальциневрина	48–73%
ХПН	18–79%
Почечно-заместительная терапия	9,5%
Метаболический синдром	17–41%
Ожирение	30–40%
Сахарный диабет	35–45%
Артериальная гипертензия	60–70%
Гиперлипидемия	50–70%
Злокачественные новообразования	3,1–14,4%
Лимфопролиферативные заболевания	1–2,8%
Рак кожи	1,8–7,4%
Рак губы / полости рта	0,2–0,8%
Рак ануса / анального канала	0,1–0,4%
Рак легкого	0,3–1,7%
Рак колоректальный	0,2–0,4%
Рак груди	0,2–0,5%
Рак простаты	0,1–0,4%
Инфекционные осложнения	
Бактериальные	27–48%
Грибковые	5–42%
Вирусные	2–29%

Table 1
Complications of immunosuppressive therapy after liver transplantation

Complication type	Frequency
Nephrotoxicity of Calcineurin Inhibitors	48–73%
Chronic renal failure	18–79%
Renal replacement therapy	9.5%
Metabolic Syndrome	17–41%
Obesity	30–40%
Diabetes mellitus	35–45%
Arterial hypertension	60–70%
Hyperlipidemia	50–70%
Malignant Neoplasms	3.1–14.4%
Lymphoproliferative diseases	1–2.8%
Skin cancer	1.8–7.4%
Lip / oral cavity cancer	0.2–0.8%
Anus / anal canal cancer	0.1–0.4%
Lung cancer	0.3–1.7%
Colorectal cancer	0.2–0.4%
Breast cancer	0.2–0.5%
Prostate cancer	0.1–0.4%
Infectious Complications	
Bacterial	27–48%
Fungal	5–42%
Viral	2–29%

Развитие нефротоксичности ингибиторов кальциневрина – такролимуса и циклоспорина – приводит к поражению почек и возникновению хронической почечной недостаточности в течение 1–13 лет после ТП у 18–79% реципиентов [1, 3, 5, 6]; метаболический синдром развивается у 17–41% пациентов, при этом у 30–40% пациентов этой группы риска развивается ожирение, у 35–45% – сахарный диабет, у 60–70% – артериальная гипертензия, и гиперлипидемия – у 50–70% пациентов [1, 3, 7]. Риск развития злокачественных новообразований подвергаются 3,1–14,4% реципиентов [1, 3, 8]. Наиболее серьезную угрозу иммуносупрессивной терапии составляют инфекционные осложнения, которые, по данным литературы [9], являются наиболее частой причиной неблагоприятных исходов трансплантации в течение 1 года после операции. Бактериальные осложнения развиваются у 27–48% реципиентов [10], грибковые в 5–42% случаев [11], вирусные – 2–29% [10, 12].

Уменьшение осложнений ИСТ после трансплантации печени возможно за счет применения альтернативных иммунодеплецирующих технологий, позволяющих, с одной стороны, редуцировать дозу стандартной медикаментозной терапии (ингибиторы кальциневрина, микофенолаты, глюкокортикостероиды, лимфоплецирующие препараты), а с другой стороны – полностью либо частично заместить иммуносупрессивный эффект этих препаратов без риска развития отторжения.

Перспективным направлением в иммунологии и трансплантологии на сегодняшний день являются клеточные биотехнологии с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Иммуномодулирующие свойства МСК позволяют рассматривать их как средство иммуносупрессивной терапии с минимальным количеством осложнений и побочных эффектов [13].

В настоящее время известно, что мезенхимальные стволовые клетки представляют собой популяцию негемопозитических стволовых клеток, которые наряду со способностью к самовоспроизводству и дифференцировке в клетки мезодермальной линии (остеобласты, адипоциты, хондроциты, фибробласты/миофибробласты) могут взаимодействовать с клетками иммунной системы и изменять их активность, создавая иммунотолерантную среду как для самих МСК, так и для окружающих клеток и тканей [13].

В 2006 г. Международным обществом клеточной терапии (ISCT, Ванкувер, Канада) были определены «минимальные критерии мезенхимальных стволовых клеток» [14]:

- 1) способность к адгезии и пролиферации на пластиковой подложке при культивировании в стандартных условиях;
- 2) экспрессия маркеров CD105, CD73, CD90; отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 и антигена II класса гистосовместимости HLA-DR;
- 3) способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондроциты *in vitro*.

На сегодняшний день внимание исследователей-трансплантологов сосредоточено на изучении механизмов и эффектов иммуномодулирующего действия МСК, позволяющих подавлять иммунные реакции в организме реципиента и индуцировать иммунологическую толерантность к аллоантигенам пересаженных органов [15].

■ ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОСУПРЕССИВНОГО ЭФФЕКТА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Доклинические исследования МСК продемонстрировали их иммуносупрессивные свойства при трансплантации солидных органов.

W. Zang и соавт. (2009) в экспериментальном исследовании на грызунах показали, что введение мезенхимальных стволовых клеток после трансплантации почки способствовало снижению экспрессии генов провоспалительных цитокинов – интерферона- γ (ИНФ- γ) и фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) (табл. 2). Применение МСК способствовало увеличению продолжительности функционирования трансплантатов и уменьшению степени выраженности реакции отторжения по сравнению с группой животных без супрессии. Однако эти показатели были хуже по сравнению с группой, получавшей МСК в комбинации с циклоспорином (CsA) [16].

M. Franquesa и соавт. (2012) показали эффективность применения МСК при хронической нефропатии трансплантата. Их введение коррелировало со снижением провоспалительных цитокинов (особенно IL-6) и повышением секреции противовоспалительных (IL-10), а также с уровнем факторов фиброза (bFGF, CTGF, α SMA). Это способствовало торможению прогрессирования гломерулосклероза, васкулопатии и протеинурии [17].

F. Casiraghi и соавт. (2012) продемонстрировали роль CD4+CD25+FoxP3+ T-регуляторных клеток (T-reg) как ключевого механизма иммуномодулирующего действия МСК. Было показано, что

Таблица 2**Применение МСК при трансплантации почки в эксперименте**

Авторы	Механизмы действия	Клинический эффект
W. Zang (2007) [16]	Снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (ИНФ-γ, ФНО-α)	Увеличение длительности функционирования трансплантатов. Снижение степени выраженности отторжения
M. Franquesa и соавт. (2012) [17]	Снижение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6). Повышение уровня противовоспалительных цитокинов (IL-10). Снижение факторов фиброза (bFGF, CTGF, αSMA)	Замедление прогрессирования гломерулосклероза, васкулопатии, протеинурии
F. Casiraghi и соавт. (2012) [18]	Влияние на Т-регуляторные лимфоциты	Предтрансплантационное введение МСК снижает повреждение трансплантата

Table 2**Experimental application of MSCs in kidney transplantation**

Authors	Mechanisms of action	Clinical effect
W. Zang (2007) [16]	Decrease of gene expression of pro-inflammatory cytokines (INF-γ, TNF-α)	Increase of duration of the grafts functioning. Reduction of rejection severity
M. Franquesa et al. (2012) [17]	Decrease of pro-inflammatory cytokines level (IL-6) Increase of anti-inflammatory cytokines level (IL-10) Reduction of fibrosis factors (bFGF, CTGF, αSMA)	Slowing the progression of glomerulosclerosis, vasculopathy, proteinuria
F. Casiraghi et al. (2012) [18]	Effect on T-regulatory lymphocytes	Pre-transplant application of MSCs reduces the graft damage

предтрансплантационное введение сингенных МСК позволяет уменьшить повреждение графта и получить эффективный иммуносупрессивный эффект [18].

D. Chabannes и соавт. (2007) продемонстрировали иммуносупрессивный эффект МСК в модели гетеротопической трансплантации сердца (табл. 3). Было показано, что индукция МСК снижает пролиферацию Т-эффекторов (Т-хелперов и Т-киллеров). В группе животных, получавших МСК, было выявлено значительное удлинение сроков функционирования трансплантатов – в среднем 23 дня, в сравнении с контрольной группой – 6 дней [19].

F. Popp (2008) и E. Eggenhofer (2011) были проведены исследования по эффективности применения МСК в комбинации с мофетил микофенолатом (ММФ) в различных комбинациях. Результаты эксперимента у обоих исследователей продемонстрировали значительное увеличение выживаемости сердечных графтов при использовании комбинации донорспецифичных и аутологичных МСК с ММФ. Обнаружено повышение популяции Т-регуляторных лимфоцитов у животных и подавление созревания и активации дендритных клеток (ДК) [20, 21].

Таблица 3**Применение МСК при трансплантации сердца в эксперименте**

Авторы	Механизмы действия	Клинический эффект
D. Chabannes и др. (2007) [19]	Подавление пролиферации Т-эффекторов	Способствуют увеличению сроков функционирования трансплантата
F. Popp и др. (2008) [20] E. Eggenhofer и др. (2011) [21]	Увеличение Т-рег лимфоцитов. Снижение дендритных клеток	Увеличение выживаемости сердечных графтов при использовании комбинации МСК с ММФ

Table 3
Experimental application of MSCs in heart transplantation

Authors	Mechanisms of action	Clinical effect
D. Chabannes et al. (2007) [19]	Suppression of T-effectors proliferation	Increase of duration of the grafts functioning
F. Popp et al. (2008) [20] E. Eggenhofer et al. (2011) [21]	Increase of T-reg lymphocytes level. Decrease of dendritic cells level	Increase of survival rate of cardiac grafts in combination of MSCs with MMF

Интересные данные были получены при изучении иммуномодулирующего эффекта МСК при трансплантации таких высокоиммуногенных тканей, как послойные кожные лоскуты (табл. 4).

S. Lee и соавт. (2014) in vivo на модели пересадки аллогенного полнослойного кожного лоскута на грызунах продемонстрировали иммуносупрессивный эффект МСК. В группе животных, получавших МСК, гистологическое исследование кожных лоскутов свидетельствовало об отсутствии признаков отторжения, а также отмечались значительное снижение уровня провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-6) и рост уровня вазоэндотелиального фактора роста (VEGF), что сопровождалось увеличением выживаемости графтов [22].

Y. Kuo и соавт. (2012) при трансплантации аллогенного гемилицевого графта у свиней показали, что применение клеточной культуры увеличивало сроки выживания трансплантатов по сравнению с контрольной группой (без иммуносупрессии) – 17–38 дней против 7–28 дней. Однако эти сроки были меньше, чем в группе, получавшей монотерапию циклоспином (CsA) (36–48 дней). Наилучшие результаты были достигнуты при комбинированной терапии МСК + CsA, где выживаемость трансплантатов составила 38–87 дней. При этом отмечалось увеличение субпопуляции Т-рег в периферической крови и тканях трансплантатов у животных, получавших МСК, а также снижение уровня TNF α и увеличение IL-10 [23].

Подобные результаты были получены P. Sbano и соавт. (2008) на грызунах при изучении выживаемости кожных трансплантатов на фоне терапии донорспецифичными МСК и циклоспорином [24].

Таблица 4
Применение МСК при трансплантации кожи в эксперименте

Авторы	Механизмы действия	Клинический эффект
S. Lee и др. (2014) [22]	Снижение уровня провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-6). Повышение уровня VEGF	Предотвращение развития отторжения. Увеличение сроков выживания трансплантатов
Y. Kuo и др. (2012) [23] P. Sbano и др. (2008) [24]	Увеличение Treg лимфоцитов в крови и тканях трансплантата. Снижение TNF α . Увеличение IL-10	Иммуносупрессивный эффект МСК. Длительные сроки выживания трансплантатов в комбинации МСК с CsA

Table 4
Experimental application of MSCs in skin transplantation

Authors	Mechanisms of action	Clinical effect
S. Lee et al. (2014) [22]	Decrease of pro-inflammatory cytokines level (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-6). Increase of VEGF level	Prevention of rejection development. Increase of the graft survival rate
Y. Kuo et al. (2012) [23] P. Sbano et al. (2008) [24]	Increase of Treg lymphocytes level in blood and graft tissues. Decrease of TNF α level. Increase of IL-10 level	Immunosuppressive effect of MSCs. Long-term grafts survival in MSCs with CsA combination

При трансплантации печени в эксперименте также были получены результаты, доказывающие иммуносупрессивный эффект МСК (табл. 5).

В 2008 г. C.D. Wan и соавт. на модели ортотопической трансплантации печени у крыс показали, что в раннем послеоперационном периоде при применении МСК отмечается меньший рост показателей, отражающих повреждение печени, – билирубина, АЛТ и АСТ – по сравнению с животными, не получавшими иммуносупрессивную терапию. Гистологическое исследование трансплантатов показало менее выраженные признаки отторжения по сравнению с контрольной группой, а также было отмечено повышение концентрации IL-10 и снижение уровня IL-2. *In vitro* был продемонстрирован ингибирующий эффект МСК на пролиферацию Т-лимфоцитов – в присутствии МСК пролиферативная активность снижалась на 48,4% [25].

Н. Wang и соавт. (2009) на модели ортотопической трансплантации печени у крыс также продемонстрировали иммуносупрессивный эффект МСК. В этом исследовании было показано, что одним из основных иммуномодулирующих эффектов МСК является увеличение популяции CD4+CD25+FoxP3+ – Т-регуляторных лимфоцитов. В группе животных, получавших МСК, уровень Т-рег и выживаемость были больше, чем в группе сравнения [26].

Таким образом, проведенный анализ экспериментального применения мезенхимальных стволовых клеток показал, что:

1. МСК обладают иммуносупрессивным эффектом.
2. Иммуносупрессивный эффект обусловлен:
 - 1) снижением концентрации и уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-2, ФНО α , ИЛ-6);
 - 2) повышением уровня противовоспалительных цитокинов;
 - 3) ингибированием пролиферации лимфоцитов реципиента и созревания эффекторных Т-клеток, АПК (в том числе дендритных клеток), а также снижением продукции донорспецифичных антител;
 - 4) индукцией образования субпопуляции Т-регуляторных клеток CD4+CD25+FoxP3+.

Таблица 5

Применение МСК при трансплантации печени в эксперименте

Авторы	Механизмы действия	Клинический эффект
C.D. Wan и др. (2008) [25]	Снижение уровня IL-2. Увеличение уровня IL-10. Ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	Иммуносупрессивный эффект МСК
Н. Wang и др. (2009) [26]	Увеличение популяции Т-рег лимфоцитов в крови	Иммуносупрессивный эффект МСК. Большая выживаемость животных при применении МСК

Table 5

Experimental application of MSCs in liver transplantation

Authors	Mechanisms of action	Clinical effect
C.D. Wan et al. (2008) [25]	Decrease of IL-2 level. Increase of IL-10 level. Inhibition of T-lymphocytes proliferation <i>in vitro</i>	Immunosuppressive effect of MSCs
H. Wang et al. (2009) [26]	Increase of the population of T-reg lymphocytes in the blood	Immunosuppressive effect of MSCs. Higher survival rate of animals with MSCs application

3. Наибольший иммуносупрессивный эффект реализуется в комбинации МСК с такими иммуносупрессантами, как ингибиторы кальциневрина (циклоспорин), и микофеноловой кислотой (ММФ).

■ КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МСК

Логичным продолжением доклинических исследований иммуносупрессивного действия мезенхимальных стволовых клеток при органных трансплантациях стало изучение их эффективности в клинической практике.

Анализ современной литературы показал, что большая часть таких работ была выполнена при трансплантации почки (табл. 6).

Пилотное исследование N. Perico и соавт. (2011) у двух реципиентов после родственной трансплантации почки с применением аутологичных МСК на фоне стандартного протокола иммуносупрессии (циклоспорин, ММФ, стероиды, симулект (анти-CD25 моноклональные антитела)) продемонстрировало хорошую функцию трансплантатов в течение первого года после операции. При этом биопсии, выполненные при выявлении увеличения уровня креатинина в раннем послеоперационном периоде, свидетельствовали о неспецифическом воспалении в трансплантате, не связанном с отторжением. Через 12 месяцев после операции у этих пациентов отсутствовали признаки хронической нефропатии трансплантата, определялся низкий уровень эффекторных Т-клеток памяти и высокий уровень Т-регуляторных клеток [27].

Проведенное J. Tap и соавт. (2012) одноцентровое проспективное открытое рандомизированное исследование у 159 реципиентов почечных трансплантатов от живого донора показало, что индукция иммуносупрессии аутологичными МСК способствовала более быстрому восстановлению функции трансплантата после пересадки по сравнению с пациентами со стандартной индукцией ИС симулектом и глюкокортикоидными стероидами. Острое клеточное отторжение наблюдалось у 7,6% реципиентов в группе с применением клеточной терапии и в 21,5% – в группе сравнения, где использовалась стандартная иммуносупрессия. К 12-му месяцу наблюдения скорость клубочковой фильтрации (СКФ) во всех группах исследования была приблизительно одинаковой [28].

N. Perico и соавт. (2013), основываясь на ранее полученных результатах [27], изменили протокол исследования и провели инфузию аутологичных МСК на предтрансплантационном этапе (2 пациента). В раннем послеоперационном периоде дисфункции трансплантатов не отмечалось. Через 12 месяцев у первого пациента гистологически наблюдались лишь признаки нефротоксичности ингибиторов кальциневрина, у второго пациента определялись признаки перенесенного острого клеточного отторжения, развившегося на 17-е сутки после операции и купированного пульс-терапией. При исследовании мононуклеаров периферической крови наблюдалось снижение количества эффекторных Т-клеток памяти и увеличение популяции Т-регуляторных клеток по сравнению с предтрансплантационным периодом [29].

H. Lee и соавт. (2013) применяли необычный путь введения донорспецифичных МСК – внутрикостно в правую подвздошную кость реципиентов во время трансплантации почки от живого донора. Исследование включало 7 пациентов. При введении МСК не отмечалось

каких-либо побочных реакций. За весь период наблюдения описаны 3 случая острого отторжения (1 антитело-зависимое и 2 клеточных), купированных соответствующей протоколам терапией. Все графты через 1 год функционировали удовлетворительно, средний уровень креатинина плазмы был 1,23 мг/дл. Увеличение количества Т-регуляторных клеток и уровня IL-10 как возможный механизм иммуномодулирующего действия МСК наблюдалось у двух из семи пациентов. Введение МСК было безопасным и эффективным [30].

В 2013 г. пилотное клиническое исследование Y. Peng и др. проводилось с целью изучения безопасности и эффективности использования МСК совместно с такролимусом. В исследование было включено 6 реципиентов почки от живого донора. Пациенты получали 50%-ную дозу такролимуса. Контрольная группа состояла также из 6 пациентов со 100%-ной дозой такролимуса. Терапию МСК в этой группе не применяли. Обе группы наблюдались в течение 12 месяцев. В течение всего

Таблица 6
Применение МСК при трансплантации почки в клинической практике

Авторы	Механизмы действия	Клинический эффект
N. Perico и др. (2011) [27]	Снижение уровня эффекторных Т-клеток памяти. Повышение уровня Т-регуляторных клеток	Профилактика развития хронической нефропатии трансплантата в течение 1 года после трансплантации
J. Tap и др. [28]	Снижает риск развития отторжения в раннем послеоперационном периоде в 3 раза	
N. Perico и др. (2013) [29]	Снижение уровня эффекторных Т-клеток памяти. Повышение уровня Т-регуляторных клеток	Профилактика отторжения при предтрансплантационном введении
H. Lee и др. (2013) [30]	Увеличение уровня Т-регуляторных клеток. Повышение противовоспалительных цитокинов (IL-10)	Применение МСК является безопасным, не сопровождается развитием побочных эффектов. Не вызывает развития смешанного химеризма
Y. Peng и др. 2013 [31]	Увеличение В-клеток памяти (CD19+CD27+)	Применение МСК является безопасным, не сопровождается развитием побочных эффектов. Снижает риск развития острого клеточного отторжения
M.J.E. Reinders и др. (2013) [32]	Купирование тубулита. Купирование интерстициального фиброза и тубулярной атрофии	Лечение субклинических форм отторжения. Профилактика развития хронической нефропатии трансплантата
A.V. Vanikar и др. (2014) [33]	Применение МСК является безопасным. Использование МСК в комбинации с ГСК улучшает пятилетнюю выживаемость трансплантатов. Использование МСК снижает частоту острого отторжения. МСК позволяет поддерживать терапевтическую концентрацию ИКН на более низком уровне	
C. Mudrabettu и др. (2015) [34]	Применение МСК является безопасным, не сопровождается развитием нежелательных явлений. Использование МСК снижает частоту развития CMV-инфекции и полиомавирусной нефропатии трансплантата	

Table 6
Application of MSCs in kidney transplantation in clinical practice

Authors	Mechanisms of action	Clinical effect
N. Perico et al. (2011) [27]	Decrease of the level of effector memory T-cells. Increase of the level of T-regulatory cells	Prevention of development of chronic nephropathy of the graft within 1 year after transplantation
J. Tan et al. [28]	Reduction of the risk of rejection in the early postoperative period by 3 times	
N. Perico et al. (2013) [29]	Decrease of effector memory T-cells level. Increase of T-regulatory cells level	Pre-transplant application of MSCs prevent rejection of the graft
H. Lee et al. (2013) [30]	Increase of T-regulatory cells level. Increase of anti-inflammatory cytokines level (IL-10)	Application of MSCs is safe; it is not accompanied by the development of adverse events. Application of MSCs does not cause mixed chimerism
Y. Peng et al. 2013 [31]	Increase of the memory B cells level (CD19+CD27+)	MSCs application is safe; it is not accompanied by the development of adverse events. Reduction of the risk of acute cellular rejection development
M.J.E. Reinders et al. (2013) [32]	Block development of tubulitis. Block development of interstitial fibrosis and tubular atrophy	Treatment of subclinical forms of rejection. Prevention of chronic graft nephropathy development
A.V. Vanikar et al. (2014) [33]	Application of MSCs is safe. MSCs application in combination with HSCs improves five-year graft survival. MSCs reduce the incidence of acute rejection. MSC allows to maintain the therapeutic concentration of CNi at a lower level	
C. Mudrabettu et al. (2015) [34]	Application of MSCs is safe; it is not accompanied by the development of adverse events. Application of MSCs reduces the incidence of CMV infection and polyomavirus graft nephropathy	

периода наблюдения не было зафиксировано каких-либо побочных эффектов от введения МСК. В контрольной группе было зафиксировано 1 острое отторжение. За 12 месяцев наблюдения у всех пациентов отмечалась стабильная функция почечных графтов. В экспериментальной группе через 3 месяца после трансплантации было выявлено увеличение пула В-клеток памяти (CD19+CD27+). Введение МСК было признано безопасным [31].

В исследовании M.J.E. Reinders и др. (2013), в которое были включены 6 пациентов после трансплантации почки от живого донора, плановые биопсии выполнялись через 4 недели и через 6 месяцев после трансплантации. Выявленные у этих пациентов при гистологическом исследовании субклинические признаки отторжения (тубулит) и ИФ/ТА были купированы введением аутологичных МСК [32].

A.V. Vanikar и соавт. (2014) провели проспективное, открытое, неслепое, рандомизированное клиническое исследование по изучению иммуномодулирующих функций МСК и ГСК при трансплантации почки от живого донора. В исследование было включено 285 реципиентов. Авторы применяли комбинированные протоколы индукции иммуносупрессии в группах исследования, включающие тотальное облучение лимфоидной ткани с последующим введением жировых МСК и ГСК. Данное исследование указывает на безопасность и эффективность применения стволовых клеток при трансплантации. По результатам, полученным в исследовании, у реципиентов, получавших клеточную терапию, наблюдалось увеличение выживаемости трансплантатов по сравнению с группой, не получавшей клеточную терапию (пятилетняя выживаемость трансплантатов МСК в комбинации с ГСК – 94,7%, в группе с ГСК – 95,7%, в группе без клеточной терапии – 84%). При этом в группе, получавшей клеточную терапию, частота эпизодов отторжений была также меньше, а уровень циклоспорина был ниже [33].

C. Mudrabettu и соавт. (2015) в пилотном исследовании иммуномодулирующей функции аутологичных МСК при трансплантации почки от

живого донора у 4 пациентов показали, что в течение 6 месяцев после трансплантации уровень креатинина плазмы был достоверно ниже, в сравнении с данным показателем у реципиентов со стандартной ИСТ. Введение МСК было безопасным, не сопровождалось нежелательными явлениями. Авторы акцентировали внимание на том, что при клеточной терапии отсутствовало такое инфекционное осложнение, как ЦМВ-инфекция. При этом при плановых биопсиях у этих пациентов гистологически не обнаруживались признаки отторжения и полиомавирусной нефропатии [34].

В работе Felix C. Popp et al. (2011) были опубликованы результаты первой фазы клинического исследования безопасности клинического применения «third-party» МСК костного мозга у пациентов после трансплантации печени (табл. 7). В исследование были включены 24 пациента (4 группы по 6 реципиентов). Первое введение МСК пациентам осуществлялось в воротную вену интраоперационно непосредственно после реперфузии, второе введение проводилось на 3-и сутки после операции внутривенно. Использовался эскалационный «3+3» дизайн исследования определения безопасности клеточного продукта: первая группа пациентов получала минимальную дозу клеточного продукта согласно данному дизайну исследования – 2 введения по 150×10^6 клеток (разовое введение составляло 150×10^6 клеток без учета веса пациента, первое интраоперационно интрапортально, второе – на 3-и сутки после операции внутривенно); пациенты второй и последующих групп получали на 150×10^6 клеток больше, чем в предыдущей, – по 300×10^6 клеток соответственно (150×10^6 клеток + 150×10^6 клеток), всего 2 введения; а в третьей группе – по 450×10^6 клеток (300×10^6 клеток + 150×10^6 клеток), 2 введения. Пациенты четвертой группы исследования получали максимальную дозу – 2 введения по 600×10^6 клеток (максимальная доза клеточного продукта – 600×10^6 клеток – это 50% от безопасной экспериментальной дозы) [35].

Наряду с МСК, иммуносупрессивный протокол включал введение глюкокортикостероидов, препараты микофеноловой кислоты и анти-CD25 моноклональные антитела. Ингибиторы кальциневринов не применялись.

Таблица 7
Результаты применения МСК у пациентов после трансплантации печени с острым почечным повреждением

Показатель	Группа МСК (n=10)	Группа стандартной ИСТ (n=20)	p
СКФ ₄ (мл/мин)	25±4,1	23±5,3	ns
СКФ ₁₄ (мл/мин)	53±8,4	31±7,8	0,015
ΔСКФ (мл/мин)	30±13,7	10±9,2	0,005
Креатинин ₁₄ (мкмоль/л)	86±18,9	126±34,9	0,01
Такролимус ₁₄ (нг/мл)	0,9±0,64	4,1±2,03	0,02
ОКТ ₇	2 (20%)	6 (30%)	–
ОКТ ₁₄	0	0	–
RAI ₇	4,5	5	–

Table 7
Results of MSCs application in patients after liver transplantation with acute renal injury

Indicator	MSCs group (n=10)	Standard IS group (n=20)	p
GFR ₄ (ml/min)	25±4.1	23±5.3	ns
GFR ₁₄ (ml/min)	53±8.4	31±7.8	0.015
ΔGFR (ml/min)	30±13.7	10±9.2	0.005
Creatinine ₁₄ (mkmol/l)	86±18.9	126±34.9	0.01
Tacrolimus ₁₄ (ng/ml)	0.9±0.64	4.1±2.03	0.02
ACR ₇	2 (20%)	6 (30%)	–
ACR ₁₄	0	0	–
RAI ₇	4.5	5	–

Сравнительный анализ результатов данного протокола не проводился, так как это была первая фаза исследования и изучалась только безопасность способа. Авторами было отмечено, что побочных эффектов при внутривенном и внутривенном введении не отмечалось: пациенты контролировались в течение 90 дней, если развивалось отторжение, выполнялась биопсия и коррекция иммуносупрессии. Во II и III фазах клинического исследования планировалось провести изучение клинической эффективности [35].

Протокол исследования

Research protocol

Таблица 8**Применение МСК при трансплантации печени в клинической практике**

Авторы	Клинический эффект
Felix C. Popp и др. (2011) [35]	Применение МСК является безопасным, не сопровождается развитием нежелательных явлений
Наши результаты (2015)	Применение МСК является безопасным, не сопровождается развитием нежелательных явлений. МСК обладают хорошим иммуносупрессивным эффектом, предотвращают развитие острого клеточного отторжения. Использование МСК после трансплантации печени позволяет отсрочить назначение такролимуса и способствует восстановлению почечной функции в ранние сроки после операции

Table 8**Application of MSCs in liver transplantation in clinical practice**

Authors	Clinical effect
Felix C. Popp et al. (2011) [35]	Application of MSCs is safe; it is not accompanied by the development of adverse events
Our results (2015)	Application of MSCs is safe; it is not accompanied by the development of adverse events. MSCs demonstrate efficient immunosuppressive effect, prevent the development of acute cellular rejection. MSCs application after liver transplantation allows to delay the administration of tacrolimus and promotes the renal function recovering in the early period after surgery

На базе ГУ «Минский НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии» эффективность применения МСК была показана в пилотном исследовании у 30 пациентов после трансплантации печени.

Показанием к применению МСК явилось отсроченное назначение такролимуса с целью предотвращения его нефротоксического эффекта у пациентов с острым почечным повреждением в раннем послеоперационном периоде.

В группе исследования МСК вводились в суммарной дозе 4×10^6 /кг массы тела, в период с 4-х суток по 14-е сутки после операции, всего 4 введения (см. рисунок). Иммуносупрессивная терапия в группе исследования включала ММФ по 1 г в сутки, медрол 16 мг в сутки и редуцированную дозу такролимуса (концентрация в крови составляла не более 3 нг/мл). Пациенты в группе сравнения получали стандартную иммуносупрессию (такролимус с целевой концентрацией 5–7 нг/мл, ММФ 1 г/сутки, медрол 16 мг/сутки).

Как показали результаты нашего исследования, применение МСК способствовало более раннему восстановлению почечной функции у пациентов после трансплантации. К моменту завершения протокольной терапии в группе пациентов, получавшей МСК, СКФ составила 53 ± 8 мл/мин по сравнению с группой сравнения – 25 ± 4 мл/мин. При этом частота и тяжесть (по RAI) острого клеточного отторжения (ОКТ) в группах была одинакова, а средний уровень такролимуса в группе исследования составил $0,9 \pm 0,64$ нг/мл (0 – $2,4$ нг/мл).

Нежелательных явлений при введении МСК не было зафиксировано.

■ ДИСКУССИЯ

Результаты многочисленных доклинических и клинических исследований МСК при трансплантации солидных органов показали, что мезенхимальные стволовые клетки являются эффективным и безопасным

средством иммуносупрессивной терапии, способным комплексно влиять на различные составляющие иммунной системы.

Свой иммуномодулирующий потенциал МСК проявляют посредством гуморальных и контактных механизмов, которые реализуются путем снижения концентрации и уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов, либо наоборот – повышением уровня противовоспалительных.

Воздействие на клетки иммунной системы приводит к ингибированию пролиферации, подавлению активности эффекторных иммунокомпетентных клеток и способствует росту субпопуляции регуляторных и супрессорных клеток. Это позволяет создавать в организме реципиента толерогенную среду, снизить реактивность на аллоантигены и, соответственно, благоприятно влиять на выживаемость трансплантатов и пациентов после операции.

Наличие иммуносупрессивных свойств позволяет использовать биомедицинский клеточный продукт для иммуносупрессивной терапии как в качестве самостоятельной иммуносупрессии, так и в дополнение к стандартной иммуносупрессивной терапии для усиления либо замещения ее компонентов.

Тем не менее, в настоящее время в мире отсутствуют стандартизированные протоколы и рекомендации (руководства) по применению мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени. Имеющийся экспериментальный и клинический мировой опыт применения МСК при органных трансплантациях показывает, что разработка альтернативной технологии иммуносупрессивной терапии при трансплантации печени с использованием МСК является актуальным, перспективным направлением и позволит улучшить результаты лечения пациентов после трансплантации печени.

Считаем, что целесообразным является разработка методов применения МСК у пациентов при трансплантации печени:

- 1) с почечной дисфункцией и хронической почечной недостаточностью для редукции дозировки либо отмены ингибиторов кальциевых каналов;
- 2) для усиления иммуносупрессивной терапии у реципиентов группы иммунологического риска для предотвращения развития отторжения;
- 3) для проведения индукции иммуносупрессии у пациентов в группе инфекционного и онкологического риска без ущерба для безопасности пациента;
- 4) у пациентов с лейкопенией при невозможности назначения препаратов микофенолатов.

■ ВЫВОДЫ

1. Применение мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени и почки является безопасным методом иммуносупрессивной терапии; внутривенное введение клеток не сопровождается развитием нежелательных явлений и побочных эффектов.
2. Использование МСК в комбинации со стандартной иммуносупрессивной терапией при трансплантации печени и почки приводит к снижению количества иммунологических осложнений.

3. Применение МСК позволяет поддерживать уровень ИКН на более низких концентрациях без риска развития иммунологических осложнений.
4. Использование МСК при трансплантации печени и почки создает толерантный фон за счет:
 - 1) увеличения уровня Т-регуляторных лимфоцитов и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10);
 - 2) снижения уровня эффекторных Т-клеток.
5. У пациентов, получавших МСК в отдаленном периоде после трансплантации, наблюдалась хорошая функция графтов.
6. Использование МСК предотвращает риск развития инфекционных осложнений (CMV, BK).
7. Использование МСК в раннем послеоперационном периоде позволяет отсрочить назначение такролимуса и способствует раннему восстановлению почечной функции.

Вклад авторов: Коротков С.В. – разработка концепции и дизайна исследования, сбор материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка текста; Носик А.В. – сбор материала, подготовка текста; Примакова Е.А. – сбор материала, подготовка текста, редактирование; Петровская Е.Г. – сбор материала, подготовка текста, редактирование; Назарова Е.А. – сбор материала, подготовка текста, редактирование; Дедюля Н.И. – сбор материала, подготовка текста, редактирование; Ефимов Д.Ю. – сбор материала, подготовка текста; Пикиреня И.И. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование; Щерба А.Е. – разработка концепции и дизайна исследования, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование; Кривенко С.И. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование; Руммо О.О. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование.

Authors' contribution: Korotkov S. – development of research conception and design, collection of material, statistical data processing, analysis of the results of research, preparation of the text; Nosik A. – collection of material, preparation of the text; Primakova E. – collection of material, preparation of the text, editing; Petrovskaya E. – collection of material, preparation of the text, editing; Nazarova E. – collection of material, preparation of the text, editing; Dyadyulya N. – collection of material, preparation of the text, editing; Efimov D. – collection of material, preparation of the text; Pikirenaya I. – development of research conception and design, analysis of the results of research, preparation of the text, editing; Shcherba A. – development of research conception and design, statistical data processing, analysis of the results of research, preparation of the text, editing; Krivenko S. – development of research conception and design, analysis of the results of research, preparation of the text, editing; Rummo O. – development of research conception and design, analysis of the results of research, preparation of the text, editing.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ahmad J, Friedman S, Dancygier H. (2014) *Mount Sinai expert guides. Hepatology*. Wiley Blackwell, 594 p.
2. Millson C. (2020) Adult liver transplantation: UK clinical guideline – part 2: surgery and post-operation. *Frontline Gastroenterology*, vol. 11, no 5, pp. 1–12.
3. Busuttill R., Klintmalm G. (2015) *Transplantation of the liver*. Elsevier, 1567 p.
4. Taner T. (2017) Liver Transplantation: Rejection and Tolerance. *Liver Transplantation*, vol. 23, no 5, suppl. 1, pp. 85–88.
5. Duvoux C., Pageaux G. (2011) Immunosuppression in liver transplant recipients with renal impairment. *Journal of Hepatology*, vol. 54, pp. 1041–1054.
6. Weber M., Ibrahim H., Lake J. (2012) Renal dysfunction in liver transplant recipients: evaluation of the critical issues. *Liver Transplantation*, vol. 18, no 11, pp. 1290–1301.
7. Watt K. (2013) Extrahepatic Implications of Metabolic Syndrome. *Liver Transplantation*, vol. 19, suppl. 2, pp. 56–61.
8. McCaughan G., Vajdic C. (2013) De Novo Malignant Disease After Liver Transplantation. Risk and Surveillance Strategies. *Liver Transplantation*, vol. 19, suppl. 2, pp. 62–67.
9. Fishman J.A. (2007) Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med*, no 357, pp. 2601–2614.
10. Romero F.A., Razonable R.R. (2011) Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol*, vol. 3, no 4, pp. 83–92.
11. Hellinger W.C. (2005) Risk Stratification and targeted antifungal prophylaxis for prevention of aspergillosis and other invasive mold infections after liver transplantation. *Liver Transplantation*, vol. 11, no 6, pp. 656–662.
12. Azevedo L.S. (2015) Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *CLINICS*, vol. 70, no 7, pp. 515–523.
13. Vandermeulen M. (2014) Rationale for the potential use of mesenchymal stromal cells in liver transplantation. *World J Gastroenterol*, vol. 20, no 44, pp. 16418–16432.
14. Dominici M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, vol. 8, no 4, pp. 315–317.
15. Franquesa M. (2013) Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MISOT) Fourth Meeting: Lessons Learned from First Clinical Trials. *Transplantation*, vol. 96, no 3, pp. 234–238.
16. Zhang W., Qin C., Zhou Z.M. (2007) Mesenchymal Stem Cells Modulate Immune Responses Combined With Cyclosporine in a Rat Renal Transplantation Model. *Transplant. Proc.*, vol. 39, no 10, pp. 3404–3408.
17. Franquesa M. (2012) Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model. *Stem Cells Dev.*, vol. 21, no 17, pp. 3125–3135.
18. Casiraghi F. (2012) Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation. *Am. J. Transplant.*, vol. 12, no 9, pp. 2373–2383.
19. Chabannes D. (2007) Brief report A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, vol. 110, no 10, pp. 3691–3694.
20. Popp F. (2008) Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl. Immunol.*, vol. 20, no 1–2, pp. 55–60.
21. Eggenhofer E. (2011) Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl. Immunol.*, vol. 25, no 2–3, pp. 141–147.
22. Lee S.M., Lee S.C., Kim S.-J. (2014) Contribution of human adipose tissue-derived stem cells and the secretome to the skin allograft survival in mice. *J. Surg. Res.*, vol. 188, no 1, pp. 280–289.
23. Kuo Y. (2012) Immunomodulatory Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Swine Hemi-Facial Allotransplantation Model. *PLoS One*, vol. 7, no 4, pp. 1–10.
24. Sbano P. (2008) Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 300, no 3, pp. 115–124.
25. Wan C. (2008) Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 7, no 1, pp. 29–33.
26. Wang Y. (2009) Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Acute Rejection of Rat Liver Allografts in Association With Regulatory T-Cell Expansion. *Transplant. Proc.*, vol. 41, no 10, pp. 4352–4356.
27. Perico N. (2011) Autologous Mesenchymal Stromal Cells and Kidney Transplantation: A Pilot Study of Safety and Clinical Feasibility. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no 2, pp. 412–422.
28. Tan J. (2012) Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA*, vol. 307, no 11, pp. 1169–1177.
29. Perico N. (2013) Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transpl. Int.*, vol. 26, no 9, pp. 867–878.
30. Lee H. (2013) Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study. *J. Transl. Med.*, vol. 11, p. 96.
31. Peng Y. (2013) Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation*, vol. 95, no 1, pp. 161–168.
32. Reinders M.E.J., Rabelink T.J., de Fijter J.W. (2013) The role of mesenchymal stromal cells in chronic transplant rejection after solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 18, no 1, pp. 44–50.
33. Vanikar A.V. (2014) Co-infusion of donor adipose tissue-derived mesenchymal and hematopoietic stem cells helps safe minimization of immunosuppression in renal transplantation – single center experience. *Ren. Fail.*, vol. 36, no 9, pp. 1376–1384.
34. Mudrabettu C. (2015) Safety and efficacy of autologous mesenchymal stromal cells transplantation in patients undergoing living donor kidney transplantation: A pilot study. *Nephrology*, vol. 20, no 1, pp. 25–33.
35. Felix C. Popp (2011) Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation—a phase I study (MISOT-I). *Journal of Translational Medicine*, 9, p. 124.

Подана/Submitted: 14.06.2021

Принята/Accepted: 06.09.2021

Контакты/Contacts: skorotkov@tut.by