



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.2.010>
УДК 616.36-089.843-06-08:602.9



Коротков С.В.¹✉, Лебедь О.А.², Смольникова В.В.¹, Пикирения И.И.³, Щерба А.Е.¹,
Кривенко С.И.¹, Руммо О.О.¹

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

² Городское клиническое патологоанатомическое бюро, Минск, Беларусь

³ Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Применение мезенхимальных стволовых клеток для лечения дисфункции трансплантата печени, вызванной хроническим отторжением. Клинический случай

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Коротков С.В. – разработка концепции и дизайна исследования, сбор материала, обработка данных, анализ полученных данных, подготовка текста; Лебедь О.А. – сбор материала, анализ полученных данных, подготовка текста; Смольникова В.В. – сбор материала, анализ полученных данных, подготовка текста; Пикирения И.И. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование; Щерба А.Е. – разработка концепции и дизайна исследования, 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.

Подана: 08.02.2022

Принята: 23.05.2022

Контакты: skorotkov@tut.by

Резюме

Развитие осложнений иммуносупрессивной терапии (ИСТ) после трансплантации печени (ТП) требует ее минимизации. Минимизация иммуносупрессии в отдаленном периоде после трансплантации у 8% пациентов сопровождается развитием хронического отторжения (ХО).

Цель работы – демонстрация успешного лечения ХО трансплантата печени с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на фоне минимизации ИСТ у пациентки с почечным повреждением (ПП).

Пациентке с нерезектабельным альвеококкозом печени была проведена ТП. После операции пациентка получала трехкомпонентную ИСТ, которая через шесть месяцев была деэскалирована до монотерапии такролимусом (Тас). Через год после операции у пациентки развилась дисфункция трансплантата, которая сопровождалась максимальным ростом АСТ до 511 Ед/л и АЛТ до 507 Ед/л, ГГТП до 1753 Ед/л и ЩФ до 474 Ед/л. ИСТ была эскалирована: проведена дважды пульс-терапия глюкокортикостероидами, добавлены мофетила микофенолат, mTOR-ингибиторы, внутривенный иммуноглобулин. Трижды выполненная пункционная биопсия печени продемонстрировала хронизацию аллоиммунного конфликта. Развитие острого ПП на этапе терапии отторжения потребовало снижения дозировки Тас, что привело к росту цитолиза и холестаза. Инфузия аллогенных МСК в суммарной дозе 8×10^6 клеток на кг

привела к нормализации лабораторных показателей. Концентрация Тас составила 0,8 нг/мл; функция почек восстановилась: уровень мочевины составил 7,1 ммоль/л, креатинина – 80 мкмоль/л, СКФ – 25 мл/мин. Применение МСК способствовало формированию толерогенного фона: отмечались рост супрессорной субпопуляции Т-регуляторных CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ лимфоцитов и снижение эффекторных CD3+CD8+naïve Т-лимфоцитов, антиген-презентирующих миелоидных дендритных клеток и антител-продуцирующих CD19+naïve В-лимфоцитов.

МСК могут быть использованы при ХО как эффективный способ альтернативной ИСТ, позволяющей замещать иммуносупрессивный эффект базовых иммуносупрессантов.

Ключевые слова: альвеококкоз печени, мезенхимальные стволовые клетки, иммуносупрессивная терапия, трансплантация печени, хроническое отторжение, острое почечное повреждение

Korotkov S.¹✉, Lebed' O.², Smolnikova V.¹, Pikirenya I.³, Shcherba A.¹, Krivenko S.¹, Rummo O.¹

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

² City Clinical Pathological Bureau, Minsk, Belarus

³ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Application of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Liver Graft Dysfunction Caused by Chronic Rejection. Case Report

Conflict of interest: nothing to declare.

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; Lebed' O. – collection of material, analysis of the results of research, preparation of the text; Smolnikova V. – collection of material, analysis of the results of research, preparation of the text; Pikirenya 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.

Submitted: 08.02.2022

Accepted: 23.05.2022

Contacts: skorotkov@tut.by

Abstract

Development of immunosuppressive therapy (IST) complications after liver transplantation (LT) requires its minimization. Decrease of immunosuppression in the long-term period after transplantation in 8% of patients is accompanied with the development of chronic rejection (CR).

Purpose of the work – to demonstrate the successful treatment of liver transplant CR with mesenchymal stem cells (MSCs) in patient with acute kidney injury (AKI) and IST minimizing. Patient with unresectable liver alveococcosis underwent LT. After surgery patient received a



three-component IST, which after six months was de-escalated to tacrolimus monotherapy (Tac). A year after the operation graft dysfunction developed, which was accompanied by a maximum increase of AST up to 511 U/l and ALT up to 507 U/l, GGTP up to 1753 U/l and ALP up to 474 U/l. IST was escalated: pulse therapy with glucocorticosteroids was performed twice; mycophenolate mofetil, mTOR inhibitors, intravenous immunoglobulin were added. Thrice performed puncture liver biopsy demonstrated the chronicity of the alloimmune conflict. Developed AKI in the process of anti-rejection therapy required decreasing of Tac, which led to increase of cytolysis and cholestasis. Infusion of allogeneic MSCs with a total dose of 8×10^6 cells per kg led to normalization of laboratory blood tests. The Tac concentration was 0.8 ng/ml; kidney function recovered: urea level was 7.1 mmol/l, creatinine – 80 μ mol/l, GFR – 25 ml/min. Application of MSCs formed immunotolerance: the suppressor subpopulation of T-regulatory CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low} lymphocytes increased and effector CD3+CD8+naïve T-lymphocytes, antigen-presenting myeloid dendritic cells, and antibodies-producing CD19+ naïve B-lymphocytes decreased. MSCs can be used in CR as an effective alternative IST that can replace the immunosuppressive effect of basic immunosuppressants.

Keywords: liver alveococcosis, mesenchymal stem cells, immunosuppressive therapy, liver transplantation, chronic rejection, acute kidney injury

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время трансплантация является единственным радикальным методом лечения пациентов с терминальными заболеваниями печени. Долгосрочная десятилетняя выживаемость после трансплантации печени, по данным различных авторов, достигает 70% [1, 2]. Хорошие результаты лечения после операции связаны с адекватной иммуносупрессивной терапией. Тем не менее прием иммуносупрессантов (ИС) сопряжен с развитием осложнений, обусловленных в первую очередь нефротоксичностью базовых препаратов группы ингибиторов кальцинейрина (ИКН) – такролимуса и циклоспорина. Частота развития поражения почек, по данным литературы, составляет 48–73%, при этом у 18–79% пациентов в послеоперационном периоде развивается хроническая почечная недостаточность, 10% из них впоследствии нуждаются в проведении почечно-заместительной терапии [3, 4].

Коррекция неблагоприятных последствий приема ИКН возможна за счет снижения дозы такролимуса и циклоспорина. Однако такой подход может привести к развитию отторжения и нарушению функции трансплантата [5]. Минимизация иммуносупрессивной терапии в отдаленном периоде после трансплантации у 8% пациентов сопровождается хронизацией аллоиммунного конфликта [6].

Развитие хронического отторжения является сложной медицинской задачей, особенность лечения которой заключается в персонифицированном подходе к эскалации иммуносупрессивной терапии с соблюдением баланса между глубиной иммуносупрессии и побочными эффектами ИС.

В настоящее время безопасной альтернативой протокольной иммуносупрессии 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 [7].

Целью данной публикации явилась демонстрация клинического случая успешного лечения хронического отторжения трансплантата печени с применением мезенхимальных стволовых клеток на фоне минимизации базового иммуносуппрессанта такролимуса у пациентки с почечным повреждением.

■ КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка К., 70 лет, была поставлена в лист ожидания на трансплантацию печени по поводу нерезектабельного альвеококкоза печени.

По данным компьютерной томографии в левой доле печени S2,3,4 определялось гиподенсивное в центре и гиперденсивное по периферии образование неоднородной плотности с наличием обызвествления капсулы; в контрастные фазы интенсивного накопления вещества не наблюдалось; в венозную фазу отмечалась гиподенсивность средних отделов печени на всем протяжении; в правой доли печени визуализировались расширенные внутripеченочные протоки; левая печеночная вена, левая печеночная артерия и левая ветвь воротной вены не прослеживались. Данная рентгенологическая картина соответствовала паразитарному поражению печени (альвеококкоз) с распространением на билиарную конfluэнцию и бифуркацию воротной вены. Внеорганного поражения выявлено не было.

Из-за инвазии ворот печени патологическим процессом трансплантация была выбрана как метод окончательного лечения.

По лабораторным показателям пациентка перед операцией была компенсирована (табл. 1). Отмечался умеренный холеста́з, который проявлялся повышением уровня ЩФ и ГГТП до 603 Е/л и 230 Е/л соответственно.

Пациентке была выполнена ортотопическая трансплантация печени от умершего донора со смертью мозга (табл. 2) по классической методике (с удалением ретропеченочного отдела нижней полой вены) (табл. 3).

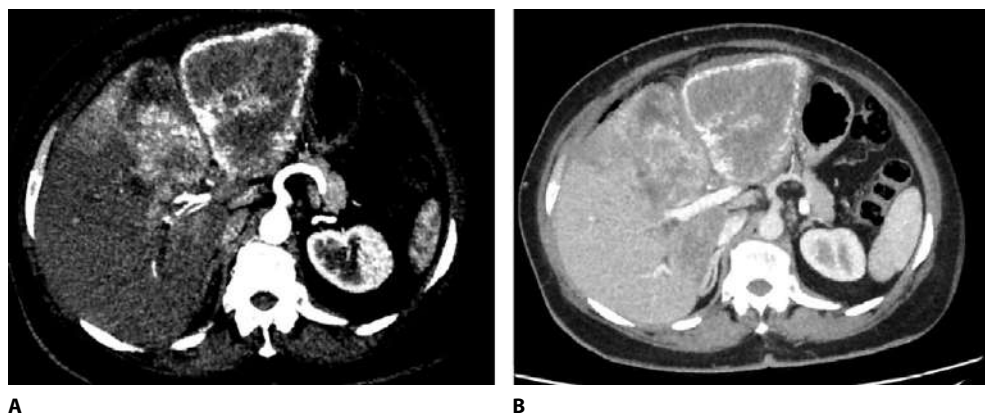


Рис. 1. Компьютерная томография брюшной полости пациентки до трансплантации:

А – артериальная фаза; В – венозная фаза

Fig. 1. Computed tomography of the patient's abdomen before transplantation: A – arterial phase; B – venous phase



Таблица 1
Динамика лабораторных показателей
Table 1
Dynamics of laboratory tests

	До ТП	1 СПО	3 СПО	5 СПО	7 СПО	10 СПО
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	12,1	17,2	15,8	12,3	16,3	10,2
Гемоглобин, г/л	131	103	94	95	98	106
Тромбоциты, $10^{12}/\text{л}$	291	209	229	155	201	277
Билирубин, мкмоль/л	26	18	16,8	13,9	9,7	10,1
Альбумин, г/л	40	33,5	34	31,2	32,8	37,5
АСТ, Е/л	60	968	304	177	103	47
АЛТ, Е/л	81	468	63	107	111	86
ЩФ, Е/л	603	266	242	240	203	163
ГГТП, Е/л	230	151	264	491	345	262
Мочевина, ммоль/л	5,3	11,3	28,3	8,2	8,6	5,7
Креатинин, мкмоль/л	69	138	238	75	88	77
СКФ цистатин С, мл/мин	36	18	11,4	25	40	41
С-реактивный белок, мг/мл	15,2	60	41	38	23	45
МНО	1,16	1,42	1,2	1,04	1,06	1,01
Концентрация такролимуса, нг/мл	0	0	0,9	10,4	3	4,5

Примечания: ТП – трансплантация печени, СПО – сутки после операции.

Таблица 2
Характеристики донора
Table 2
Donor characteristics

Характеристика	Показатели
Возраст	43 года
Причина смерти мозга	Инсульт
Пол	Муж.
Длительность ИВЛ	4 сут.
Гемоглобин	114 г/л
Лейкоциты / ПЯ	$16 \times 10^9/\text{мл}$ / 3%
АСТ/АЛТ	56/59 Ед/мл
Na	131 ммоль/л
Гепатоз	Нет
Вазопрессорная поддержка	Нет

Для индукции иммуносупрессивной терапии было введено на 0 и 4-е сутки после операции (СПО) 20 мг базиликсумаба (антагонист рецептора ИЛ-2R α -лимфоцитов) и метилпреднизолон 500 мг, 250 мг и 125 мг на 0, 1, 2-е СПО соответственно. Поддерживающая иммуносупрессивная терапия (ИСТ) включала такролимус со 2-х СПО, мофетил микофенолат в дозе 1 г/сут с 4-х СПО и медрол 20 мг/сут с 3-х СПО.

Послеоперационный период протекал без хирургических осложнений. Динамика лабораторных показателей в послеоперационном периоде представлена в табл. 1.

Таблица 3
Характеристики хирургического этапа лечения
Table 3
Characteristics of the surgical period of treatment

Характеристика	Показатели
Время общей ишемии трансплантата	570 мин
Время тепловой ишемии трансплантата	40 мин
Агепатический период	46 мин
Кровопотеря	1300 мл
Кавальная реконструкция	Резекция ретропеченочного отдела НПВ; над-, подпеченочный кавакавальные анастомозы
Портальная реконструкция	Порто-портальный анастомоз
Артериальная реконструкция	ОПА донора + ОПА реципиента
Билиарная реконструкция	Холедохо-холедоанастомоз

Примечания: НПВ – нижняя полая вена; ОПА – общая печеночная артерия.

Особенностью течения раннего послеоперационного периода явилось развитие острого почечного повреждения (табл. 1), что сопровождалось максимальным повышением уровня мочевины (28,3 ммоль/л) и креатинина (238 мкмоль/л) к 3-м СПО и снижением уровня СКФ до 11,4 мл/мин и диуреза до 460 мл/сут (табл. 1). Введение такролимуса с 3-х СПО было приостановлено и возобновлено с 7-х СПО в минимальной дозировке по 2 мг/сут под лабораторным контролем почечной функции и концентрации такролимуса (табл. 1).

Пациентка в удовлетворительном состоянии была выписана на амбулаторное лечение на 12-е СПО.

В течение года после операции пациентка чувствовала себя удовлетворительно, клинико-лабораторные показатели были в норме (рис. 2). Глюкокортикостероиды (ГКС) были отменены через 2 месяца после трансплантации, мофетила микофенолат (ММФ) – через 6 месяцев. Медиана концентрации такролимуса на амбулаторном этапе в течение года составила 4,95 нг/мл (минимальная – 3,2 нг/мл; максимальная – 8,5 нг/мл).

Через год после операции на 361-е СПО на фоне стабильного состояния и оптимального для этого срока после операции режима иммуносупрессивной терапии у пациентки развилась дисфункция трансплантата (рис. 2), что сопровождалось желтухой, холестазом и цитолизом. Уровень билирубина составил 156 мкмоль/л, ГГТП – 221 Ед/л, ЩФ – 437 Ед/л, АСТ – 511 Ед/л и АЛТ – 507 Ед/л (рис. 2).

Проведено обследование, по данным УЗИ ОБП, КТ, МРТ хирургического субстрата дисфункции выявлено не было. Маркеры вирусных гепатитов, оппортунистической инфекции и аутоиммунной патологии печени были отрицательные.

Выполнена пункционная биопсия печени (рис. 3). Диагностировано позднее клеточное отторжение трансплантата. Назначена пульс-терапия (ПТ) ГКС (метилпреднизолон 500 мг в сутки, 3 дня), поддерживающая ИСТ эскалирована до трех компонентов (такролимус 5 г в сутки, ММФ 1 г в сутки, медрол 24 мг в сутки после окончания проведения ПТ).

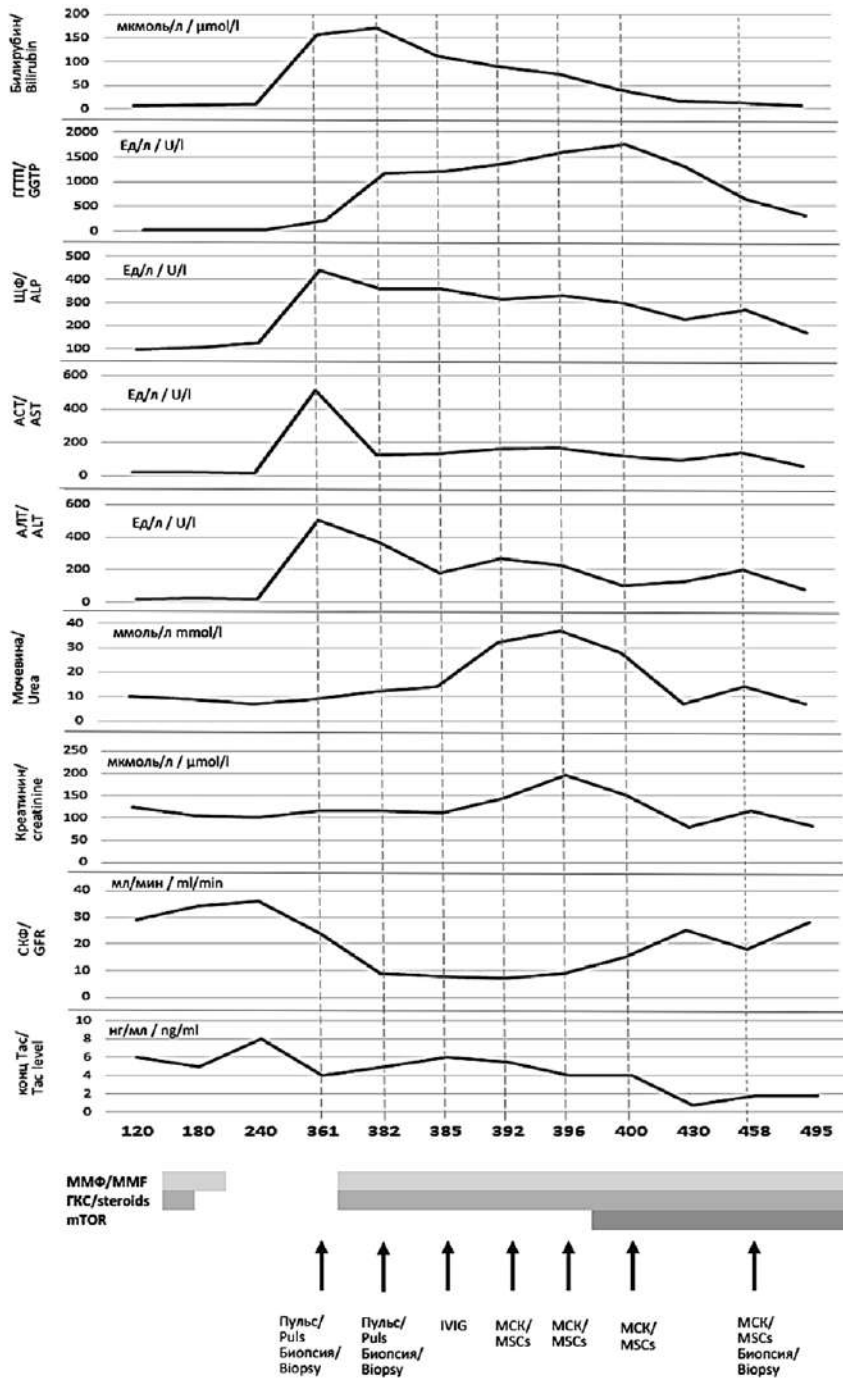


Рис. 2. Иммуносупрессивная терапия в послеоперационном периоде и лабораторные показатели
Fig. 2. Immunosuppressive therapy in the postoperative period and laboratory tests

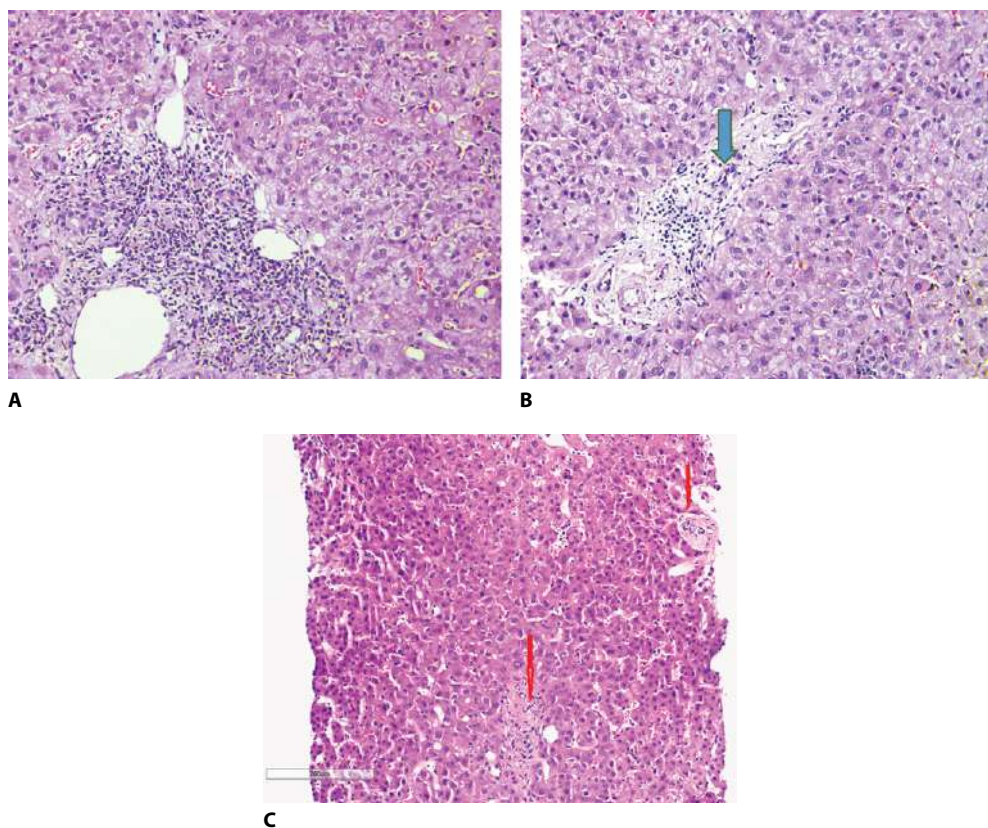


Рис. 3. Биопсия трансплантата печени (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$):
А – 361-е СПО, умеренное воспаление воротной вены с расширением портальных трактов, умеренное повреждение желчных протоков; В – 382-е СПО, повреждение желчных протоков с эозинофильной трансформацией цитоплазмы, увеличением ядер и их нерегулярностью; воспаление воротной вены отсутствует; С – 458-е СПО, незначительная портальная воспалительная инфильтрация с исчезновением желчных протоков

Fig. 3. Liver transplant biopsy (hematoxylin and eosin staining, $\times 200$):
A – 361 POD, moderate inflammation of the portal vein with dilatation of the portal tracts, moderate damage of the bile ducts; B – 382 POD, bile duct injury with eosinophilic transformation of the cytoplasm, an increase in nuclei and their irregularity; absence of the portal vein inflammation; C – 458 POD, insignificant portal inflammatory infiltration with disappearance of the bile ducts

К 382-м СПО отмечалось уменьшение выраженности цитолитического синдрома, сопровождающегося снижением АСТ до 127 Ед/л и АЛТ до 371 Ед/л. Тем не менее, несмотря на проводимую терапию, продолжился рост холестаза. Уровень билирубина к 382-м СПО составил 172 мкмоль/л, ГГТП – 1171 Ед/л, ЩФ – 381 Ед/л. Был проведен повторный курс пульс-терапии стероидами. Результаты гистологического исследования повторной биопсии показали признаки раннего хронического клеточного отторжения (рис. 3).

Ввиду отсутствия эффекта на ПТ глюкокортикостероидами, что сопровождалось нарастанием уровня ГГТП до 1212 Ед/л и АСТ до 133 Ед/л, на 385-е СПО к лечению был



добавлен внутривенный иммуноглобулин (IVIg) в суммарной дозе 2 г/кг. При этом проведенный мультиплексный анализ на платформе Luminex показал отсутствие донор-специфических антител.

На 392-е СПО (31-е сутки лечения дисфункции) у пациентки развилось острое почечное повреждение (ОПП): уровень мочевины повысился до 32 ммоль/л, креатинина – до 143 мкмоль/л, СКФ по цистатину С снизилась до 7 мл/мин; отмечалось снижение суточного диуреза до 600 мл в сутки.

Развитие ОПП потребовало редукции дозы такролимуса (с 5 мг до 2 мг в сутки) с целью снижения его токсического воздействия на почечную функцию. Такролимус полностью не отменяли ввиду усугубляющейся иммунологической дисфункции трансплантата: отмечался продолженный рост ГТП до 1601 Ед/л, АСТ до 160 Ед/л и АЛТ до 268 Ед/л (рис. 3).

Учитывая данные современной литературы [7, 8] и накопленный опыт в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» по использованию клеточных биотехнологий у пациентов после трансплантации солидных органов [9–11], для поддержания глубины иммуносупрессивной терапии и создания толерогенного фона пациентке был применен альтернативный вариант иммуносупрессивной терапии – мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Источником МСК послужила жировая ткань, полученная от доноров со смертью мозга (биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные человека ТУ ВУ 100660677.001»).

Инфузия МСК была проведена на 392-е СПО, 396-е СПО и 400-е СПО из расчета разовой дозы 2×10^6 клеток на кг массы тела пациентки (суммарно пациентка получила 523×10^6 МСК). Параллельно к 396-м СПО в схему лечения был включен четвертый компонент – mTOR-ингибитор (сертикан) в суммарной дозировке 3 мг в сутки.

С 400-х СПО (39-е сутки лечения дисфункции) у пациентки наметилась положительная динамика по функции трансплантата – началось стойкое снижение ГТП, АСТ и АЛТ (рис. 2). Отмечалась также устойчивая положительная динамика и по почечной функции – начал снижаться уровень мочевины и креатинина и наметился рост СКФ. В этой связи клеточная терапия была прекращена.

К 430-м СПО (на 69-е сутки начала лечения дисфункции трансплантата) уровень билирубина составил 17 ммоль/л, ЩФ – 299 Ед/л, ГТП – 1300 Ед/л (снижение с 1753 Ед/л на 400-е СПО), АСТ – 118 Ед/л, АЛТ – 103 Ед/л. На фоне низкой концентрации такролимуса (0,8 нг/мл) функция почек восстановилась: уровень мочевины составил 7,1 ммоль/л, креатинина – 80 мкмоль/л, СКФ – 25 мл/мин (рис. 2).

Через месяц, на 458-е СПО, при контрольном обследовании на фоне продолженного снижения ГТП отмечался незначительный рост ЩФ, АСТ и АЛТ. Инфузия МСК в количестве 169 млн клеток (из расчета 2 млн клеток на кг) привела к купированию цитолитического синдрома и положительной динамике по холестазу. Гистологическое исследование трансплантата печени показало признаки хронического отторжения (рис. 3).

Лабораторные показатели на 495-е СПО продемонстрировали удовлетворительную функцию трансплантата и отсутствие почечной дисфункции (рис. 2).

На этапе клеточной терапии у пациентки был изучен иммунный статус путем определения уровня субпопуляций иммунокомпетентных клеток в периферической крови методом проточной цитофлуометрии. Данные иммунофенотипирования представлены в табл. 4.

Таблица 4
Динамика уровня субпопуляций лейкоцитов периферической крови на фоне проводимой клеточной терапии
Table 4
Dynamics of the level of subpopulations of peripheral blood leukocytes during cell therapy

	392-е СПО		396-е СПО		400-е СПО		458-е СПО	
	До	После	До	После	До	После	До	После
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	12,98	11,57	11,45	14,7	14,7	17,33	10,88	10,37
Лимфоциты, %	21,68	18,11	16,8	14,36	14,36	22,14	14,41	12,95
Лимфоциты, ×10 ⁹ /л	2,82	2,1	1,93	2,03	2,03	3,84	1,57	1,34
CD3+ Т-лимфоциты, %	66,1	67,1	64,6	59,3	59,3	64,2	81	75
CD3+ Т-лимфоциты, ×10 ⁹ /л	1,864	1,40	1,246	1,203	1,203	2,465	0,79	1,005
CD3+CD4+, Т-хелперы, %	33,7	30,9	34	30,1	30,1	35,9	46,3	35,4
CD3+CD4+, Т-хелперы, ×10 ⁹ /л	0,950	0,648	0,656	0,611	0,611	1,378	0,449	0,474
CD3+CD8+, Т-цитотоксические, %	19,7	22,7	21,8	19,3	19,3	17,5	26,7	29,3
CD3+CD8+, Т-цитотоксические, ×10 ⁹ /л	0,555	0,476	0,420	0,391	0,391	0,672	0,259	0,392
CD4+CD25highCD127-, Т-регуляторные, %	0,96	0,32	0,39	1,39	1,39	1,5	1,64	1,36
CD4+CD25highCD127-, Т-регуляторные, ×10 ⁹ /л	0,027	0,007	0,007	0,0282	0,028	0,057	0,016	0,018
CD19, %	27,7	25,4	31,2	35,8	35,8	31,3	14,4	18,0
CD19, ×10 ⁹ /л	0,781	0,533	0,602	0,726	0,726	1,201	0,14	0,241
CD16+56, %	6,0	7,6	4,0	4,8	4,8	4,4	4,2	6,9
CD16+56, ×10 ⁹ /л	0,169	0,159	0,077	0,097	0,097	0,168	0,410	0,092
CD3+CD4+								
CD45RA+CD62L+, наивные Т-клетки, %	22,3	19,2	22,3	26,1	26,1	20,2	13,5	15,4
CD45RA+CD62L+, наивные Т-клетки, ×10 ⁹ /л	0,211	0,124	0,146	0,159	0,159	0,278	0,610	0,073
CD45RA-CD62L+, центральные Т-клетки памяти, %	42,2	40,5	46,4	44,5	44,5	48,9	51,9	48,5
CD45RA-CD62L+, центральные Т-клетки памяти, ×10 ⁹ /л	0,401	0,262	0,304	0,271	0,271	0,674	0,233	0,230
CD45RA-CD62L-, эффекторные Т-клетки памяти, %	34,6	39,2	30,2	28,4	28,4	28,4	33,6	35,2
CD45RA-CD62L-, эффекторные Т-клетки памяти, ×10 ⁹ /л	0,3288	0,2543	0,198	0,1735	0,173	0,391	0,150	0,166
CD45RA+CD62L-, терминально дифференцированные, %	1	1	1	1	1	2,5	1	0,9
CD45RA+CD62L-, терминально дифференцированные, ×10 ⁹ /л	0,009	0,006	0,006	0,0061	0,006	0,034	0,004	0,004
CD3+CD8+								
CD45RA+CD62L+, наивные Т-клетки, %	12,8	8,5	13,1	11,8	11,8	10,2	10,9	8,7
CD45RA+CD62L+, наивные Т-клетки, ×10 ⁹ /л	0,071	0,04	0,055	0,0462	0,046	0,068	0,028	0,034
CD45RA-CD62L+, центральные Т-клетки памяти, %	10,7	10,7	16,2	12,5	12,5	14,1	9,3	10
CD45RA-CD62L+, центральные Т-клетки памяти, ×10 ⁹ /л	0,059	0,051	0,068	0,0489	0,048	0,094	0,024	0,039



Окончание таблицы 4 / Table 4 end

	392-е СПО		396-е СПО		400-е СПО		458-е СПО	
	До	После	До	После	До	После	До	После
CD3+CD8+								
CD45RA-CD62L-, эффекторные Т-клетки памяти, %	33	49,1	41,7	45,3	45,3	44,5	43	49,8
CD45RA-CD62L-, эффекторные Т-клетки памяти, $\times 10^9/\text{л}$	0,183	0,234	0,175	0,1774	0,177	0,299	0,111	0,195
CD45RA+CD62L-, терминально дифференцированные, %	43,4	31,7	29	30,4	30,4	31,2	36,5	31,5
CD45RA-CD62L-, эффекторные Т-клетки памяти, $\times 10^9/\text{л}$	0,241	0,151	0,122	0,1191	0,119	0,209	0,094	0,123
Дендритные клетки								
DCm, %	0,055	0,05	0,04	0,05	0,05	0,1	0,29	0,46
DCm, $\times 10^9/\text{л}$	0,0071	0,005	0,0045	0,0073	0,007	0,017	0,031	0,047
DCp, %	0,001	0	0	0	0	0	0,005	0,005
DCp, $\times 10^9/\text{л}$	0,0001	0	0	0	0	0	0,0005	0,0051
DCp / DCm	0,0182	0	0	0	0	0	0,016	0,011
CD19+ (В-лимфоциты)								
Naïve В-лимфоциты, %	73	68	66,5	63,5	63,5	55	59,2	47,7
Naïve В-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,5702	0,3627	0,4	0,4614	0,4614	0,661	0,082	0,115
MZB-клетки памяти, %	4,4	3,4	7,7	9,4	9,4	9,8	7	11,9
MZB-клетки памяти, $\times 10^9/\text{л}$	0,0343	0,0181	0,046	0,0683	0,0683	0,117	0,009	0,028
В-клетки памяти, %	15,2	12,5	20,2	21,5	21,5	27,4	24,3	33,8
В-клетки памяти, $\times 10^9/\text{л}$	0,11873	0,0666	0,121	0,1562	0,1562	0,329	0,034	0,081
В-регуляторные клетки, %	5,1	6,4	7,2	4,1	4,1	1,4	2,3	1,4
В-регуляторные клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,03983	0,0341	0,043	0,0297	0,0297	0,016	0,003	0,003
Плазмоциты, %	1,5	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4
Плазмоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,01171	0,0032	0,001	0,0014	0,0014	0,002	0,0001	0,0009

Как показали результаты проведенного исследования иммунологических показателей, введение МСК способствовало увеличению уровня миелоидных дендритных клеток (DCm) после каждой инфузии (рис. 4). На фоне проводимого курса клеточной терапии отмечался постепенный рост общего количества DCm в периферической крови по сравнению с исходным, что составило $0,0071 \times 10^9/\text{л}$ до первого введения на 392-е СПО и $0,017 \times 10^9/\text{л}$ после 3-го введения на 400-е СПО, а также $0,047 \times 10^9/\text{л}$ на 458-е СПО (рис. 4). Незначительное снижение DCm после 1-го введения, по-видимому, связано с еще недостаточной глубиной иммуносупрессии и гиперреактивностью иммунной системы реципиентки и объясняет необходимость продолжения лечения МСК.

На фоне проведения клеточной терапии отмечался также рост основной супрессорной субпопуляции Т-регуляторных CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ лимфоцитов (Treg) (рис. 5).

Так, уровень CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ лимфоцитов на 392-е СПО до начала клеточной терапии составлял $0,027 \times 10^9/\text{л}$, а на 400-е СПО – $0,057 \times 10^9/\text{л}$. Дополнительная однократная инфузия МСК на 458-е СПО также способствовала увеличению уровня Т-регуляторных лимфоцитов с $0,016 \times 10^9/\text{л}$ до $0,018 \times 10^9/\text{л}$.

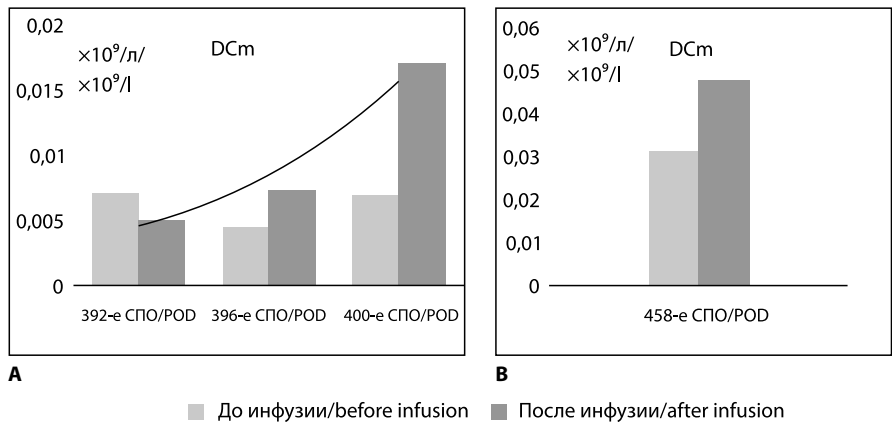


Рис. 4. Динамика уровня миелоидных дендритных клеток на фоне клеточной терапии: А – динамика DCm при трехкратном введении МСК (с 392-х по 400-е СПО); В – уровень DCm после дополнительной инфузии МСК на 458-е СПО
Fig. 4. Dynamics of the level of myeloid dendritic cells during cell therapy: А – DCm dynamics after MSC three injections (from 392 to 400 SPO); В – DCm level after additional infusion of MSCs at 458 SPO

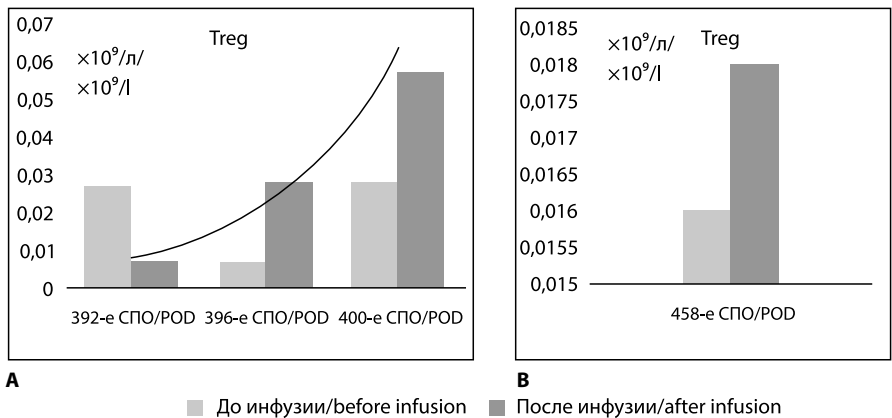


Рис. 5. Динамика уровня Т-регуляторных CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ лимфоцитов на фоне клеточной терапии: А – динамика Treg при трехкратном введении МСК (с 392-х по 400-е СПО); В – уровень Treg после дополнительной инфузии МСК на 458-е СПО
Fig. 5. Dynamics of the level of T regulatory CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ lymphocytes during cell therapy: А – dynamics of Treg after MSC triple administration three times (from 392 POD to 400 POD); В – Treg level after additional infusion of MSCs at 458 POD

Отсутствие эффекта после первой инфузии МСК на 392-е СПО подтверждает необходимость проведения курса терапии из нескольких инфузий МСК для достижения необходимого иммунологического фона реципиента.

Проведение 3 инфузий МСК в суммарной дозе 6×10^6 клеток на кг массы тела в итоге привело к снижению цитолитического и холестатического синдромов у реципиентки (рис. 2).

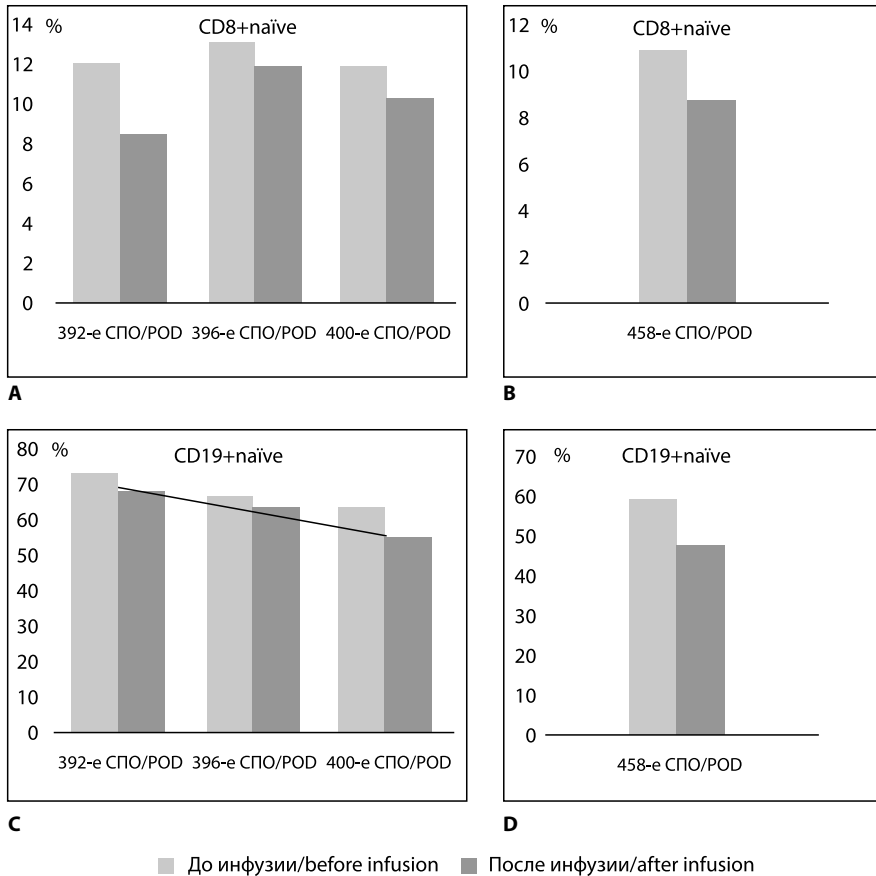


Рис. 6. Динамика уровня субпопуляций лимфоцитов периферической крови на фоне терапии МСК: А, В – динамика относительного количества CD3+CD8+naïve Т-лимфоцитов; С, D – динамика относительного количества CD19+naïve В-лимфоцитов
Fig. 6. Dynamics of the level of peripheral blood lymphocyte subpopulations during MSC therapy: А, В – dynamics of the relative amount of CD3+CD8+naïve T-lymphocytes; С, D – dynamics of the relative amount of CD19+naïve B-lymphocytes

Иммуносупрессивный эффект мезенхимальных стволовых клеток был также подтвержден снижением относительного количества лимфоцитов цитотоксической субпопуляции CD3+CD8+naïve Т-клеток и относительного количества субпопуляции В-лимфоцитов – CD19+naïve (рис. 6, табл. 4).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ лечения пациентки с хроническим отторжением трансплантата печени продемонстрировал схожие с полученными ранее в клинике результатами применения МСК при трансплантации печени и почек, что подтвердило клиническую эффективность разработанного метода при лечении данной патологии трансплантата [9–13].

Как показали ранее проведенные исследования по применению МСК для индукции иммуносупрессии при трансплантации солидных органов – МСК оказывали благоприятное влияние на течение раннего послеоперационного периода и способствовали созданию толерогенного иммунофенотипа, что сопровождалось снижением частоты развития отторжения [9, 10].

Использование МСК при развитии острого почечного повреждения непосредственно в раннем послеоперационном периоде у пациентов после трансплантации печени позволяло безопасно, без риска развития аллоиммунного конфликта, редуцировать и даже полностью отменять базовый иммуносупрессант такролимус [11].

Результаты проточной цитофлуометрии также коррелировали с полученными ранее нами данными. Так, рост количества миелоидных дендритных клеток после трансплантации почки соответствовал иммунотолерантному фенотипу, а снижение этой популяции лейкоцитов являлось прогностическим маркером позднего клеточного отторжения [12]. В то же время в отдаленном периоде после трансплантации печени, достоверным неинвазивным показателем отторжения был определен другой биомаркер – повышенный уровень субпопуляции цитотоксических CD3+CD8+ Т-лимфоцитов [13].

В данной работе, в отличие от результатов предыдущих исследований, мы получили новую корреляцию двух иммунофенотипических показателей в зависимости от выраженности реакции отторжения: основной супрессорной популяции CD3+CD4+ Т-клеток – регуляторных CD3+CD4+CD25^{high}CD127⁻ Т-лимфоцитов и субпопуляции В-лимфоцитов – CD19+naïve клеток. При отторжении отмечалось снижение количества супрессорных Treg и увеличение антител-продуцирующих В-клеток, и наоборот. Уровень данных показателей имеет логичное объяснение и позволяет их рассматривать как потенциальные неинвазивные биомаркеры отторжения. Тем не менее эти результаты получены в рамках демонстрации клинического случая и требуют дальнейшего изучения и валидации.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный клинический случай демонстрирует:

1. Эффективность мезенхимальных стволовых клеток как способа альтернативной иммуносупрессивной терапии, позволяющей замещать иммуносупрессивный эффект базовых иммуносупрессантов (ингибиторов кальцинейрина).
2. Возможность минимизации дозы такролимуса при развитии почечного повреждения на фоне хронического отторжения трансплантата без риска усугубления тяжести иммунологической дисфункции.
3. Необходимость проведения дальнейшего исследования по использованию МСК в отдаленном периоде после трансплантации с целью улучшения результатов лечения данной категории пациентов за счет снижения рисков развития почечного повреждения и частоты иммунологических осложнений, а также возможность разработки неинвазивных биомаркеров позднего отторжения трансплантата печени.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Millson C. et al. (2020) Adult liver transplantation: UK clinical guideline – part 2: surgery and post-operation. *Frontline Gastroenterology*, vol. 11, no 5, pp. 1–12.
2. Burra P. et al. (2016) EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *Journal of Hepatology*, vol. 64, no 2, pp. 433–485.
3. Duvoux C., Pageaux G. (2011) Immunosuppression in liver transplant recipients with renal impairment. *Journal of Hepatology*, vol. 54, pp. 1041–1054.
4. 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.
5. Guerrero-Domínguez R. et al. (2014) Perioperative renal protection strategies in liver transplantation. *Nefrología*, vol. 34, no 11, pp. 276–284.
6. Abdeldayem H., Allam N. (2012) Liver transplantation – basic issues. *InTech*, p. 418.
7. Vandermeulen M. et al. (2014) Rationale for the potential use of mesenchymal stromal cells in liver transplantation. *World J Gastroenterol*, vol. 20, no 44, pp. 16418–16432.
8. Popp F.C. et al. (2014) 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*, vol. 9, no 124, pp. 1–10.
9. Korotkov S. et al. (2021) Mesenchymal stem cells local therapy for induction of immunosuppression in liver transplantation: results of pilot study. *Transplant International*, vol. 34 (Suppl. 1), p. 102.
10. Korotkov S. et al. (2018) The Results of Pilot Study of the Mesenchymal Stem Cells Efficiency for Induction of Immunosuppressive Therapy in the Early Postoperative Period after Kidney Transplantation». *Transplantation*, vol. 102, no 75, p. S207.
11. Korotkov S. et al. (2015) The results of the pilot study of the mesenchymal stem cells efficiency in the early post-transplant period in order to replace the immunosuppressive effect of tacrolimus in patients with acute kidney damage and kidney failure. *Transplant International*, vol. 28, Suppl. 4, p. 14.
12. Nosik A.V. et al. (2018) Effector CD4+ T-lymphocytes and dendritic cells are non-invasive biomarkers of late cellular rejection after kidney transplantation. *Transplantology*, no 3 (10), pp. 208–216. (in Russian)
13. Korotkov S. et al. (2020) The opportunities of non-invasive liver graft rejection diagnostics by using terminally differentiated effector CD8+ T-lymphocytes. *Hepatology and Gastroenterology*, no 2, pp. 177–183. (in Russian)