

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-3-66-77

ИНДУКЦИЯ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВНУТРИПОРТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С.В. Коротков¹, Е.А. Примакова¹, А.А. Сыманович¹, О.А. Лебедь², Т.В. Лебедева¹,
А.Е. Щерба¹, С.И. Кривенко¹, О.О. Руммо¹

¹ ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

² УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро», Минск, Республика Беларусь

Введение. Несмотря на эффективность современных протоколов иммуносупрессивной терапии, частота отторжения при трансплантации печени достигает 40%. Перспективным решением этой проблемы является применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Введение МСК в регионарный кровоток трансплантата позволит усилить эффективность стандартной иммуносупрессии за счет дополнительного подавления иммунного ответа непосредственно в трансплантате. **Цель исследования:** оценить клиническую эффективность внутрипортального введения мезенхимальных стволовых клеток на этапе индукции иммуносупрессивной терапии при трансплантации печени. **Материалы и методы.** Проведено рандомизированное проспективное исследование. В основной группе ($n = 14$) выполнялась внутрипортальная инфузия МСК во время трансплантации в количестве 20×10^6 клеток, в контрольной группе ($n = 14$) реперфузия трансплантата выполнялась по стандартной методике. Оценивались безопасность методики, функциональные показатели трансплантата, частота и тяжесть отторжения, почечная функция, концентрация такролимуса. Проводились гистологические, иммуногистохимические исследования и FISH-анализ. **Результаты.** В группе МСК не зафиксировано осложнений, связанных с введением клеток. Отмечено более быстрое восстановление функции трансплантата: уровень АСТ и АЛТ был достоверно ниже на 4-е сутки ($p < 0,05$), нормализация АСТ достигнута к 10-м суткам. Частота острого отторжения в группе МСК составила 21% против 28% в группе контроля, при этом в группе МСК наблюдались только легкие и умеренные формы отторжения. Экспрессия ММП-10 была достоверно ниже в группе МСК ($p = 0,01$). Концентрация такролимуса в группе МСК была ниже при сохранении адекватной глубины иммуносупрессии, что коррелировало с более быстрым восстановлением почечной функции (креатинин на 4-е сутки: 80 против 101 мкмоль/л, $p < 0,05$). FISH-анализ подтвердил присутствие МСК в трансплантате на 7-е сутки. **Заключение.** Внутрипортальное введение МСК при трансплантации печени является безопасным методом, способствующим более быстрому восстановлению функции трансплантата, снижению тяжести отторжения и уменьшению нефротоксичности такролимуса. Метод может быть рекомендован как дополнительный компонент иммуносупрессивной терапии.

Ключевые слова: трансплантация печени, мезенхимальные стволовые клетки, внутрипортальная инфузия, острое почечное повреждение, острое отторжение трансплантата печени.

Для корреспонденции: Коротков Сергей Владимирович Адрес: 220051, Республика Беларусь, Минск, ул. Сергея Есенина, 79-115.

Тел. +375 29 1982818. E-mail: skorotkov@tut.by

Corresponding author: Sergey Korotkov. Address: 79-115, Sergeya Yesenina str., Minsk, 220051, Republic of Belarus.

Phone: +375 29 1982818. E-mail: skorotkov@tut.by

INTRAPORTAL INDUCTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FOR IMMUNOSUPPRESSION INDUCTION IN LIVER TRANSPLANTATION

S.V. Korotkov¹, E.A. Primakova¹, A.A. Symanovich¹, O.A. Lebed², T.V. Lebedeva¹, A.E. Shcherba¹, S.I. Krivenko¹, O.O. Rummo¹

¹ Minsk Scientific Research Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

² City Clinical Pathological Bureau, Minsk, Republic of Belarus

Background. Despite the effectiveness of modern immunosuppressive therapy protocols, acute rejection remains a significant challenge in liver transplantation (LT), occurring in up to 40% of cases. One promising strategy to improve graft tolerance and reduce rejection rates is the use of mesenchymal stem cells (MSCs). Administering MSCs directly into the regional circulation of the transplanted liver offers the potential to enhance the effects of standard immunosuppressive therapy by exerting a localized immunosuppressive effect at the graft site.

Objective: to evaluate the clinical efficacy of intraportal administration of MSCs during the induction phase of immunosuppressive therapy in patients undergoing LT. **Materials and methods.** A randomized prospective study was conducted involving two groups of LT recipients. In the experimental group (n = 14), patients received an intraportal infusion of MSCs during transplantation at a dose of 20×10^6 cells. The control group (n = 14) underwent standard transplant reperfusion without MSC administration. The study assessed the safety of the MSC infusion procedure, graft function, incidence and severity of acute rejection, renal function, and tacrolimus levels. Additional assessments included histological and immunohistochemical analyses, as well as fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Results.** No complications associated with MSC administration were observed. The MSC group demonstrated faster restoration of graft function, with significantly lower levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) by postoperative day 4 ($p < 0.05$), and normalization of AST achieved by day 10. The incidence of acute rejection was lower in the MSC group (21%) compared to the control group (28%), with only mild to moderate rejection observed in the MSC group. Additionally, expression of matrix metalloproteinase-10 (MMP10) was significantly reduced in the MSC group ($p = 0.01$). Tacrolimus levels were lower in the MSC group, yet adequate immunosuppression was maintained. This correlated with faster renal function recovery, with serum creatinine levels on day 4 significantly lower in the MSC group compared to controls (80 vs 101 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$). FISH analysis confirmed the presence of MSCs within the liver graft tissue on postoperative day 7. **Conclusion.** Intraportal administration of MSCs during LT is a safe approach that enhances faster graft function recovery, reduces the severity of acute rejection, and mitigates tacrolimus-associated nephrotoxicity. These findings support the potential of MSC therapy as a valuable adjunct to standard immunosuppressive regimens in LT.

Keywords: liver transplantation, mesenchymal stem cells, intraportal infusion, acute kidney injury, graft rejection.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени (ТП) является эффективным методом лечения пациентов с диффузными и очаговыми поражениями печени в терминальных стадиях болезни. Пятилетняя выживаемость после ТП от доноров со смертью мозга достигает 75%, десятилетняя – 70% [1, 2]. Ключевым фактором успеха трансплантации, обеспечивающим долгосрочную выживаемость пациентов, является иммуносупрессивная терапия (ИСТ).

Тем не менее даже при использовании современных протоколов иммуносупрессии (ИС) частота развития острого отторжения в раннем послеоперационном периоде (РПОП) остается достаточно высокой и достигает 40% [3, 4].

Перспективным направлением 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 [5–7].

Особый интерес представляет локальная терапия МСК путем их введения в регионарный кровоток трансплантата, что позволяет создать высокую концентрацию клеточного продукта непосредственно в органе-мишени. Такой таргетный подход может значительно усилить эффективность стандартных протоколов иммуносупрессии за счет направленного воздействия на механизмы иммунного ответа в трансплантате [8, 9].

В этой связи **целью исследования** явилось обоснование клинической эффективности внутрипортального введения мезенхимальных стволовых клеток на этапе индукции иммуносупрессивной терапии при трансплантации печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Для оценки эффективности внутрипортального введения МСК было проведено интервенционное рандомизированное проспективное сравнительное в двух группах исследование ($n = 28$). Основную группу составили 14 пациентов, которым во время трансплантации внутрипортально выполнялась инфузия МСК. Группу сравнения составили 14 реципиентов, у которых реперфузия донорской печени проходила по стандартной методике.

Критериями включения в исследование явились: пациенты с циррозом печени, находящиеся в листе ожидания; возраст 18 лет и старше; трансплантация печени от умершего донора; классическая методика трансплантации печени (с резекцией ретропеченочного отдела НПВ). Критерии невключения: возраст младше 18 лет, сплит-трансплантация, родственная трансплантация печени; нестандартная портальная реконструкция (рено-портальная, кава-портальная, шунто-портоанастомоз), ретрансплантация печени. Критерии исключения: первично не функционирующий трансплантат; тяжелая дисфункция трансплантата, требующая проведения ретрансплантации.

Конечные точки исследования: 1) первичные – частота развития осложнений, связанных с внутрипортальным применением МСК; частота гистологически подтвержденного отторжения трансплантата; интенсивность иммуновоспалительных реакций по данным иммуногистохимической оценки экспрессии матричной металлопротеиназы-10 (ММП-10) и каспазы-3 (Касп3); 2) вторичные – динамика восстановления функции печени, динамика восстановления функции почек, концентрация такролимуса, частота развития послеоперационных осложнений, длительность лечения.

Характеристика клеточного продукта

Для достижения поставленных целей исследования применялся биомедицинский клеточный продукт (БМКП) «Клетки мезенхимальные человека ТУ ВУ 100660677.001» (регистрационное удостоверение № ИМ-7.101480, регистрационный номер: МН-7.117650-1402 от 29.05.2014 г.). БМКП изготавливался на основе аллогенных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани доноров со смертью мозга и соответствовал «минимальным кри-

териям мезенхимальных стволовых клеток» (ISCT, 2006) [10].

Методика внутрипортального введения МСК

Разработанная методика внутрипортального введения МСК включала следующие этапы.

1. МСК вводили интраоперационно, в воротную вену трансплантата, через венозный катетер 16G, подключенный к шприцу с клеточным продуктом. Объем клеточного продукта составил 20 миллионов клеток в 20 мл физиологического раствора (0,9%) NaCl.
2. Введение МСК выполнялось после запуска портального кровотока. Скорость введения клеточного продукта составила 2 мл/мин (рис. 1).
3. После окончания инфузии клеточного продукта катетер удалялся из воротной вены, место имплантации катетера ушивалось.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование трансплантата

Пункционная биопсия трансплантата выполнялась на 7-е сутки после операции (СПО), а также по необходимости при развитии дисфункции. Наличие или отсутствие отторжения диагностировалось согласно Банффской классификации. Для количественной оценки степени тяжести острого клеточного отторжения использовался индекс активности отторжения (RAI, Rejection Activity Index). Диагностика гуморального отторжения выполнялась иммуногис-

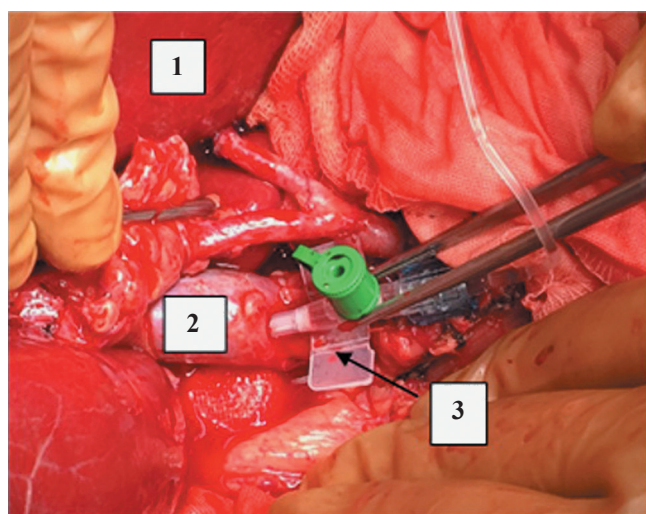


Рис. 1. Интраоперационное внутрипортальное введение мезенхимальных стволовых клеток: 1 – трансплантат; 2 – воротная вена; 3 – венозный катетер

Fig. 1. Intraoperative intraportal infusion of mesenchymal stem cells: 1 – liver graft; 2 – portal vein; 3 – venous catheter

тохимическим методом (ИГХ) с идентификацией фрагмента комплимента C4d, связанного с антителами [11–13]. В качестве дополнительного критерия верификации интенсивности аллоиммунного ответа на трансплантат проводилось иммуногистохимическое исследование тканевой экспрессии матриксной металлопротеиназы-10 и Каспазы-3 [14, 15].

Молекулярно-цитогенетическое исследование

Молекулярно-цитогенетическое исследование выполнялось методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с целью доказательства присутствия МСК в трансплантате путем определения альфа-сателлитных последовательностей в области Xp11.1–Xq11.1 и сателлитной ДНК III в области Yq12. Обязательным условием выполнения исследования для идентификации МСК в пересаженной печени явилось соблюдение принципа половой принадлежности донора, реципиента и мезенхимальных стволовых клеток – донор и реципиент должны отличаться по половому признаку с вводимым клеточным продуктом [16].

Статистические методы оценки результатов исследования

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 8.0. Анализ нормальности распределения выполнялся с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные, имеющие распределение, отличающееся от нормального, представлялись в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. Для оценки различий между группами по уровню количественного признака использовался U-критерий Манна–Уитни (MW). Для категориальных переменных проводился анализ таблиц сопряженности с применением точного критерия Фишера (F).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группы пациентов были сопоставимы по клинико-демографическим показателям (табл. 1). Средний возраст пациентов в основной группе исследования составил 46 (39; 52) лет, в контрольной группе – 47 (40; 55) (MW, $p > 0,05$). В группе МСК мужчин было 7 (50%), женщин – 7 (50%), в контрольной группе – 8 (57%) и 6 (43%) соответственно (F, $p > 0,05$).

В группе МСК показанием к трансплантации печени явились: цирроз печени (ЦП) в исходе вирусного гепатита В – 1 (7%) пациент, цирроз печени в исходе вирусного гепатита В в комбинации с вирусным гепатитом D – 2 (14%), ЦП вирусной C-этиологии – 2 (14%), ЦП HCV-этиологии в комбинации с гепатоцеллюлярным раком – 3 (21%), криптогенный цирроз печени – 3 (21%), криптогенный цирроз печени в комбинации с ГЦР – 1 (7%), первичный склерози-

рующий холангит в комбинации с холангиоцеллюлярным раком – 1 (7%), ЦП в исходе аутоиммунного гепатита – 1 (7%). В контрольной группе: ЦП HBV-этиологии – 1 (7%) пациент, ЦП HBV-этиологии в комбинации с HDV – 1 (7%), ЦП HCV-этиологии – 3 (21%), ЦП HCV-этиологии в комбинации с гепатоцеллюлярным раком – 1 (7%), ЦП в исходе NASH – 1 (7%), криптогенный цирроз печени – 2 (14%), ЦП в исходе болезни Вильсона–Коновалова – 2 (14%) пациента, ЦП в исходе ПСХ – 1 (7%) пациентов, первичный билиарный цирроз – 1 (7%), ЦП в исходе АИГ – 1 (7%) (F, $p > 0,05$).

У 10 (71%) пациентов в группе МСК индукция иммуносупрессии (ИС) выполнялась глюкокортикоидными (ГКС), у 4 (29%) – ГКС в комбинации с ингибиторами рецептора интерлейкина-2 Т-лимфоцитов (IL2RA, базиликсимаб). В контрольной группе ГКС на индукцию ИС получили 9 (64%) пациентов, ГКС + IL2RA – 5 (36%) (F, $p > 0,05$) [17].

Таблица 1

Характеристика групп исследования Clinical parameters of patients

Показатель	Группа МСК	Контрольная группа	MW, р
Реципиенты			
MELD, баллы	18 (10; 23)	19 (14; 24)	
Na, ммоль/л	137 (134; 140)	137 (136; 138)	
Билирубин, мкмоль/л	67 (18; 126)	59 (25; 118)	
МНО	1,45 (1,19; 1,81)	1,4 (1,19; 1,77)	>0,05
Мочевина, ммоль/л	4,6 (3,9; 6,7)	4,9 (4,45; 9,25)	
Креатинин, мкмоль/л	61 (51; 95)	65 (65; 101)	
СКФ, мл/мин	56 (43; 75,5)	53 (28; 70)	
Донорские факторы			
Возраст донора, лет	49 (40; 54)	48 (41; 60)	>0,05
Сутки в ОАР	4 (3; 5)	4 (3; 5)	
Hb, г/л	125 (102; 141)	130 (104; 150)	
АСТ, Е/л	49 (38; 68)	62 (46; 76)	
АЛТ, Е/л	33 (20; 91)	40 (24; 81)	
Na, ммоль/л	148 (142; 158)	151 (147; 162)	
МНО	1,27 (1,03; 1,4)	1,2 (0,94; 1,32)	
Операция			
Кровопотеря, мл	1500 (900; 2000)	1300 (1000; 2000)	
Общая ишемия, мин	515 (480; 570)	555 (460; 600)	>0,05
Тепловая ишемия, мин	45 (35; 50)	46 (40; 52)	
Агепатический период, мин	50 (38; 60)	55 (46; 60)	

Поддерживающая иммуносупрессия включала тройную терапию, состоящую из ингибиторов кальциневрина (такролимус), препаратов микофеноловой кислоты (микофенолата мофетил, ММФ) и ГКС (метилпреднизолон). Такролимус назначался с 1-х СПО в дозировке 0,1 мг/кг в сутки, при развитии острого почечного повреждения назначение откладывалось до нормализации либо стабильной положительной динамики восстановления почечной функции. При стабильной функции трансплантата на фоне ОПП поддержание концентрации такролимуса допускалось на более низком уровне (менее 5 нг/мл) [17].

При развитии острого клеточного отторжения (ACR) пациентам проводилась пульс-терапия метилпреднизолоном, при гуморальном отторжении (AMR) выполнялись сеансы плазмафереза, применялся внутривенный иммуноглобулин. При иммунологической дисфункции трансплантата к схеме лечения добавлялся четвертый иммуносупрессант группы макролидов эверолимус, дозировка препаратов микофеноловой кислоты эскалировалась до 2000 мг в сутки [17].

Результаты исследования показали, что при внутрипортальном введении МСК местных осложнений, связанных с имплантацией катетера (тромбоз, кровотечение, разрыв, повреждение задней стенки ВВ), и системных осложнений (гипотензия, нарушение сердечного ритма, гипертермия, аллергические реакции) зафиксировано не было.

Введение МСК не приводило к нарушению локальной гемодинамики в трансплантате. Скорость

кровотока по воротной вене после реперфузии и инфузии МСК в основной группе составила 33 (27; 41) см/с, в контрольной – 36 (29; 42) см/с (MW, $p > 0,05$).

Гистологическое исследование интраоперационных биоптатов трансплантата печени в обеих группах, полученных после реперфузии, продемонстрировало отсутствие тромбозов микроциркуляторного русла (рис. 2).

Анализ лабораторных данных показал, что в течение первых суток после операции у пациентов обеих групп наблюдались признаки дисфункции трансплантата, обусловленные консервационным и ишемическим-реперфузионным повреждением (рис. 3).

В последующие сутки отмечалась положительная динамика в восстановлении функции трансплантата. У пациентов, которым проводилась локальная терапия мезенхимальными стволовыми клетками, процесс восстановления происходил быстрее.

К четвертым суткам после операции показатель АСТ и АЛТ был достоверно ниже в группе МСК (рис. 4). Уровень АСТ составил в основной группе 125 (85; 321) Ед/л, в контрольной группе – 190 (140; 352) Ед/л (MW, $p = 0,02$), уровень АЛТ – 279 (125; 456) и 358 (211; 606) Ед/л соответственно (MW, $p = 0,04$).

В основной группе нормализация АСТ наблюдалась уже к десятым суткам после операции. Уровень АСТ на 10-е СПО составил 34 (19; 51) Ед/л. В группе контроля уровень АСТ на 10-е СПО превышал нор-

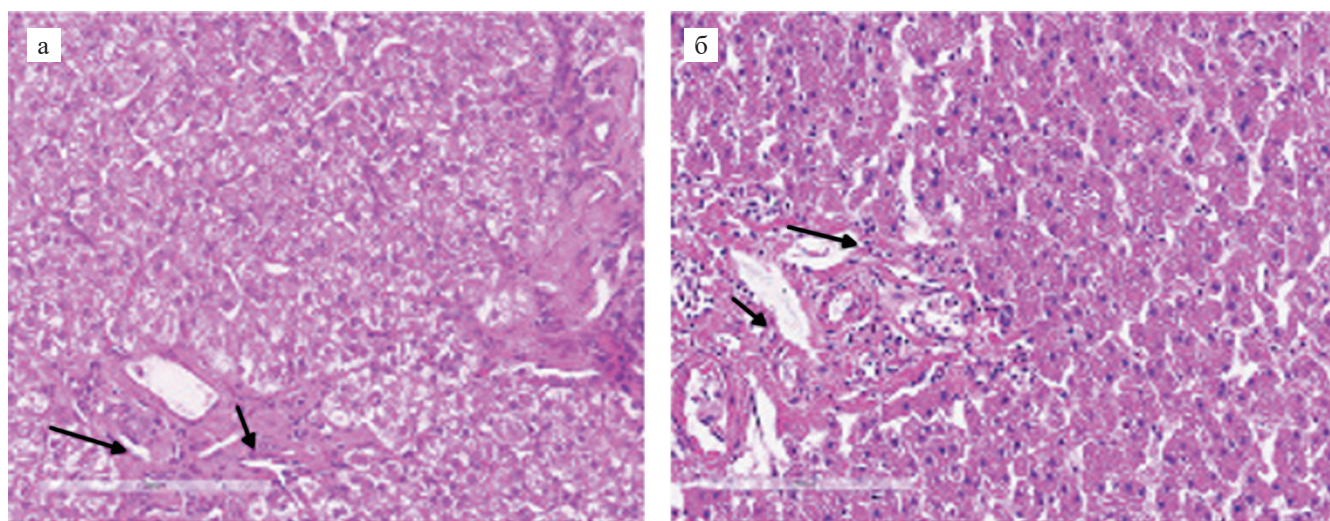


Рис. 2. Интраоперационная биопсия трансплантатов печени (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$): а – биоптат трансплантата печени после реперфузии и введения МСК (основная группа); б – биоптат трансплантата печени после реперфузии (контрольная группа). Стрелками показаны портальные капилляры со свободными просветами

Fig. 2. Intraoperative liver transplant biopsies (hematoxylin and eosin staining, 200 $\times$ magnification): а – biopsy after reperfusion and intraportal MSC administration (main group); б – biopsy after reperfusion without MSCs (control group). Arrows indicate portal capillaries with open lumens

мальное значение и был равен 53 (29; 92) Ед/л (MW, $p = 0,04$) (рис. 5).

Достоверных различий в восстановлении показателей билирубина, ЩФ, ГГТП, МНО в группах исследования получено не было (MW, $p > 0,05$).

При гистологическом исследовании биоптатов трансплантата печени у 3 (21%) пациентов основной группы было диагностировано острое клеточное отторжение; у 2 пациентов степень отторжения была легкой – 4 балла по шкале RAI, у 1 – умеренное, RAI 6 баллов. У пациентов контрольной группы отторжение трансплантата было верифицировано в 4 (28%) случаях: у 3 пациентов – клеточное, у 1 – гуморальное. При этом тяжесть острого клеточного отторжения по шкале RAI в контрольной группе была выше: 1 пациент имел умеренную степень отторжения –

RAI 7 баллов, 2 пациента – тяжелую, RAI 8 баллов (F, $p > 0,05$) (табл. 2).

Иммуногистохимическое исследование биоптатов печени, полученных на 7-е сутки после операции, включало определение экспрессии ММП-10 и Каспазы-3 для количественной оценки выраженности иммунологического повреждения трансплантата. (табл. 2).

При ИГХ-исследовании трансплантатов было выявлено, что экспрессия ММП-10 в гепатоцитах в группе МСК была достоверно ниже и составила 5% (3; 25), тогда как в контрольной группе этот показатель достигал 20% (10; 30) (MW, $p = 0,01$) (рис. 6, 7).

На рис. 7 продемонстрирована более интенсивная экспрессия ММП-10 в контрольной группе в сравнении с основной группой.

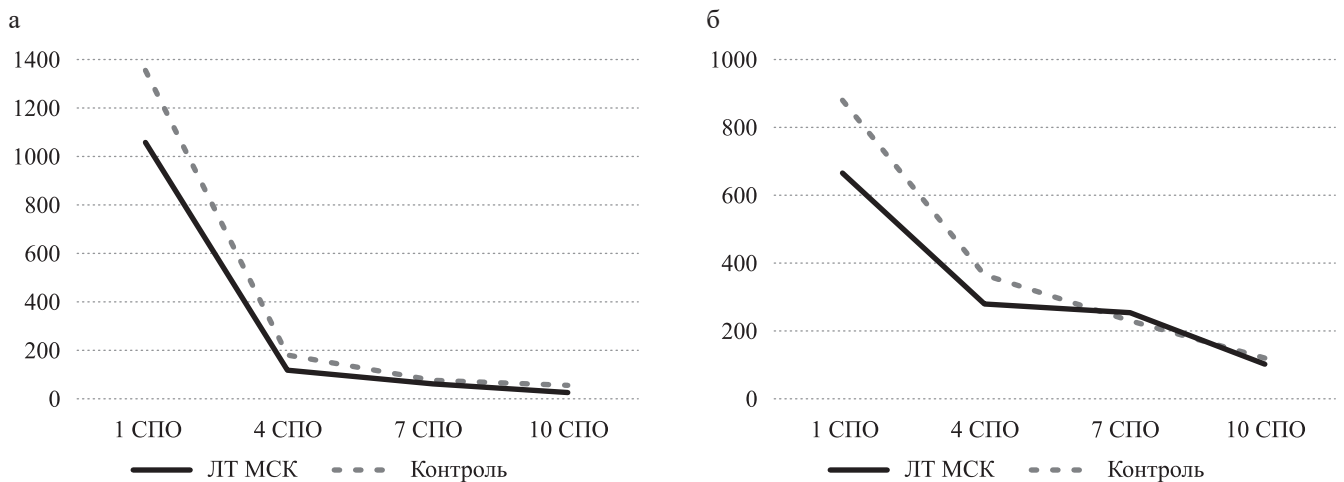


Рис. 3. Динамика АСТ и АЛТ в группах исследования: а – уровень АСТ (Ед/л); б – уровень АЛТ (Ед/л)

Fig. 3. Dynamics of AST and ALT levels in the study groups: а – AST levels (U/L); б – ALT levels (U/L)

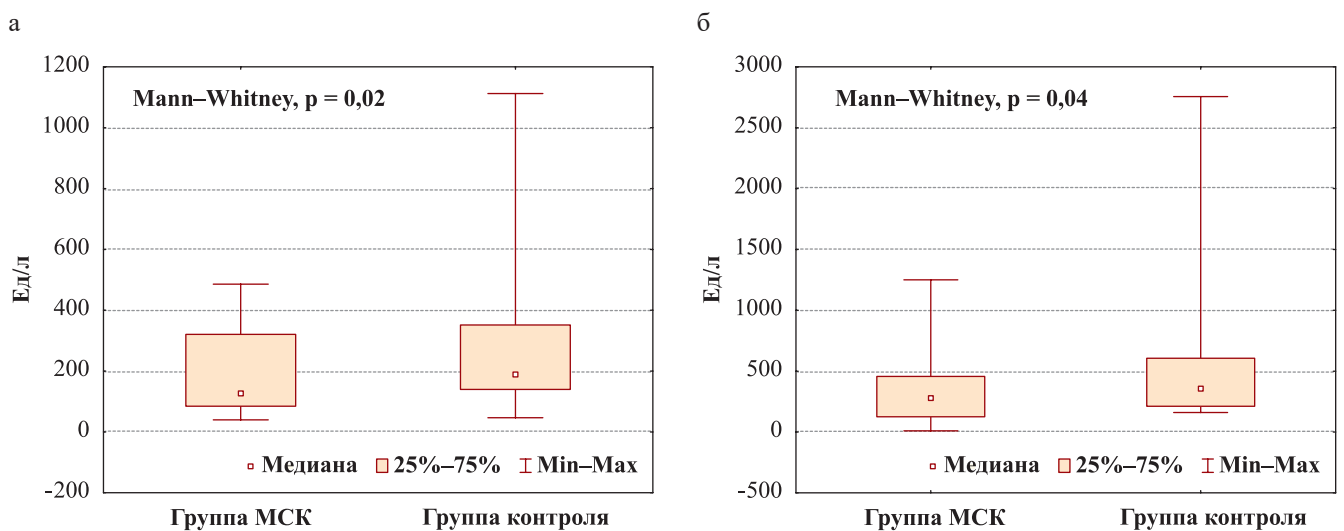


Рис. 4. Среднее значение уровня АСТ и АЛТ в группах исследования на 4-е СПО: а – уровень АСТ; б – уровень АЛТ

Fig. 4. Mean AST and ALT levels in the study groups on postoperative day (POD) 4: а – AST level; б – ALT level

Иммуногистохимический анализ экспрессии Каспазы-3 не выявил статистической значимости и составил 70 (60; 85) % и 75 (70; 90) % в группе МСК и группе контроля соответственно (MW, $p > 0,05$).

FISH-анализ, проведенный на 7-е сутки после операции, подтвердил присутствие МСК с кариотипом, отличным от донора и реципиента (рис. 8).

Определение концентрации такролимуса показало, что уровень иммуносуппрессанта в крови был ниже на протяжении всего раннего послеоперационного периода в группе МСК (табл. 3).

На 14-е сутки после трансплантации этот показатель имел статистическую значимость – концентрация такролимуса в группе МСК составила 5,2 (2,6;

6,7) нг/мл, в группе контроля – 6,7 (4,3; 9,5) (MW, $p = 0,04$).

Динамика функции почек представлена в табл. 4. В первые двое суток после операции у пациентов обеих групп отмечалось повышение уровня мочевины и креатинина, а также снижение скорости клубочковой фильтрации, что было связано с развитием периоперационного почечного повреждения.

Согласно международным рекомендациям KDIGO (2012) [18], острое почечное повреждение (ОПП) характеризуется одним из следующих признаков: 1) повышение уровня креатинина более чем в 1,5 раза, 2) увеличение креатинина на 26,5 мкмоль/л в течение 48 часов, 3) уменьшение скорости диуреза до 0,5 мл/кг/ч на протяжении 6 часов.

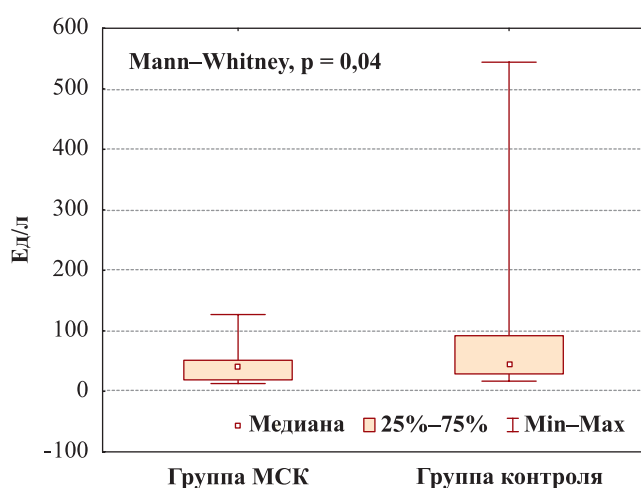


Рис. 5. Среднее значение уровня АСТ в группах исследования на 10-е СПО

Fig. 5. Mean AST levels in the study groups on postoperative day (POD) 10

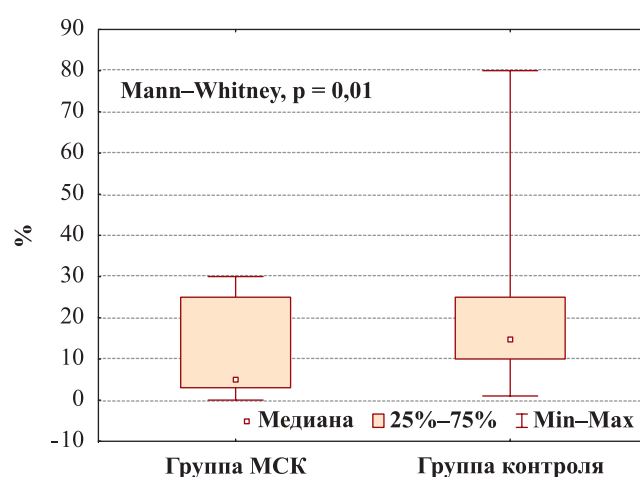


Рис. 6. Среднее значение экспрессии ММП-10 в биоптатах трансплантата печени на 7-е СПО

Fig. 6. Mean MMP-10 expression levels in liver transplant biopsies at postoperative (POD) day 7

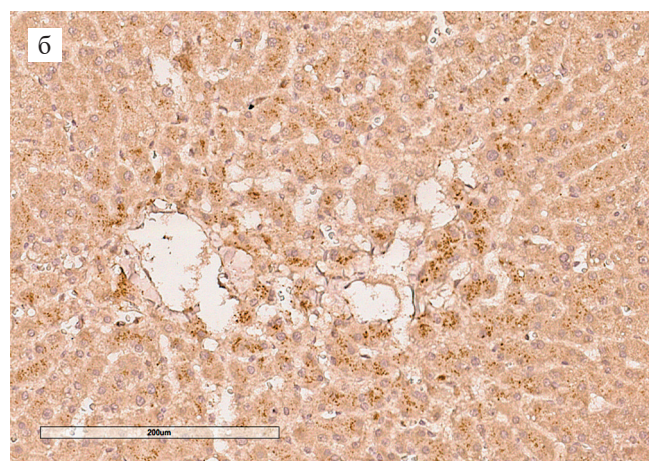
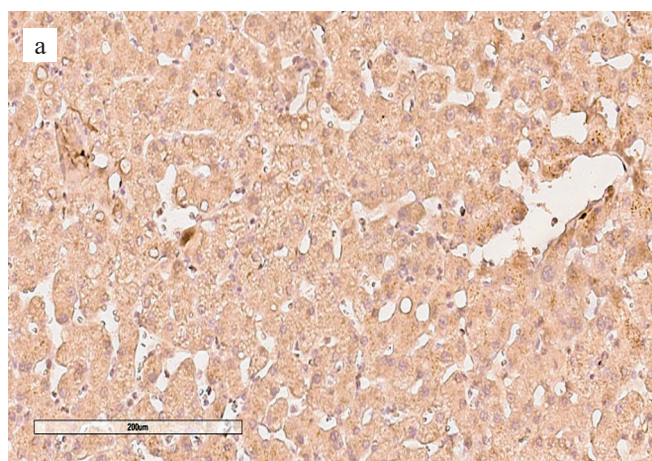


Рис. 7. Экспрессия ММП-10 в трансплантате печени: а – группа МСК, б – контрольная группа (ИГХ-окрашивание с антителами к ММП-10, $\times 200$)

Fig. 7. Immunohistochemical (IHC) staining of MMP-10 expression in liver transplant biopsies (200 $\times$ magnification): а – MSC group; б – control group

Анализ изменений функции почек показал, что отношение уровня креатинина в первые сутки после операции к дооперационному уровню составило 1,51 (1,13; 2,19) в группе МСК и 1,58 (1,32; 1,88) в контрольной группе (MW, $p > 0,05$). На вторые сутки после

Таблица 2

**Сравнительная характеристика
гистологического исследования биоптатов
трансплантата**

**Comparative histological characteristics of liver
transplant biopsies**

	Группа ЛТ МСК (n = 14)	Контрольная группа (n = 14)
Отторжение	3 (21%)	4 (28%)
ACR	3	3
Легкое (RAI 4–5)	2	–
Среднее (RAI 6–7)	1	1
Тяжелой (RAI 8–9)	–	2
AMR	–	1
ММП-10, %	5 (3; 25)*	20 (10; 30)
Каспаза-3, %	70 (60; 85)	75 (70; 90)

Примечание. * – отличие достоверно по отношению к контрольной группе, $p < 0,05$.

Note. * – indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.05$).

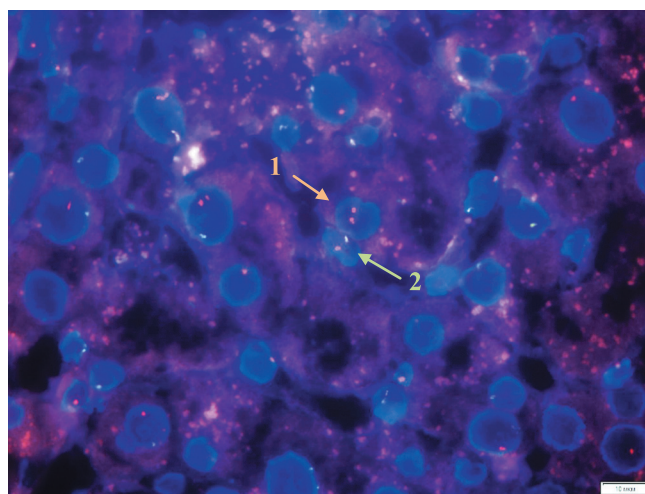


Рис. 8. FISH-исследование биоптата трансплантата: 1 – клетка с двумя копиями альфа-сателлитных последовательностей в области центромеры хромосомы X (Xp11.1–Xq11.1), остальная клеточная популяция (2) содержит альфа-сателлитную последовательность в области центромеры хромосомы X (Xp11.1–Xq11.1) и сателлитную ДНК III в области Yq12 хромосомы Y

Fig. 8. FISH analysis of liver transplant biopsy: 1 – cell with two copies of alpha satellite sequences in the centromeric region of chromosome X (Xp11.1–Xq11.1); 2 – remaining cell population containing both an alpha satellite sequence in the centromeric region of chromosome X (Xp11.1–Xq11.1) and satellite DNA III in the Yq12 region of chromosome Y

Таблица 3

Сравнительная характеристика концентрации такролимуса в группах
Comparative characteristics of tacrolimus levels between the groups

Сутки	Группа	СПО				
		2	4	7	10	14
Тас, нг/мл	МСК	0 (0; 0,6)	0,8 (0; 2)	3,2 (0,8; 4,9)	4,9 (3; 8,2)	5,2* (2,6; 6,7)
	Контр.	1 (0; 2,5)	2 (0,9; 3,4)	4,1 (2,1; 6,1)	5,7 (3,3; 7,1)	6,7 (4,3; 9,5)

Примечание. * – отличие достоверно по отношению к контрольной группе, $p < 0,05$.

Note. * – indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.05$).

Таблица 4

Сравнительная характеристика лабораторных показателей почечной функции
Comparative characteristics of laboratory indicators of kidney function

Сутки	Группа	СПО						
		0	1	2	4	7	10	14
Моч., ммоль/л	МСК	4,6 (4,1; 6,6)	10,75 (9; 13)	16,15 (12,2; 20,4)	10,8* (8; 17,2)	8,25 (5,1; 12)	7,05 (5,5; 10,1)	7,85 (5,2; 11)
	Контр.	4,9 (3,4; 7,6)	8 (6,5; 13)	14,7 (9,2; 20,8)	14 (7,4; 18)	6,1 (4,4; 8,4)	7,2 (5,8; 10,2)	7,6 (5,1; 12,2)
Креат., мкмоль/л	МСК	61 (52; 91)	110 (79; 154)	128 (70; 186)	80* (62; 123)	78,4 (57; 99)	78 (61; 108)	86 (65; 94)
	Контр.	65 (57; 84)	112 (81; 137)	118 (84; 166)	101 (70; 132)	84 (63; 108)	78 (66; 102)	82 (65; 107)
СКФ, мл/мин	МСК	56 (34; 70)	37 (20; 61)	31 (19; 47)	33 (14; 44)	45,5 (25; 57)	42,5 (32; 59)	38 (28,3; 57)
	Контр.	53 (45; 64)	32,25 (24; 45)	25 (16,2; 38)	31 (18; 50)	33 (23; 56)	41 (29; 54)	38 (24,7; 59)

Примечание. * – отличие достоверно по отношению к контрольной группе, $p < 0,05$.

Note. * – indicates a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.05$).

операции эти показатели были 1,63 (1,28; 2,49) и 1,64 (1,26; 2,43) соответственно (MW, $p > 0,05$). Разница в уровне креатинина между первым днем после операции и дооперационным уровнем составила 45 (8; 90) мкмоль/л в основной группе и 41 (21; 53) мкмоль/л в контрольной группе (MW, $p > 0,05$), а между вторым днем после операции и дооперационным уровнем – 39 (13; 125) и 50 (24; 84) мкмоль/л соответственно (MW, $p > 0,05$). Эти результаты указывают на развитие почечного повреждения в обеих группах после операции (табл. 5).

Отсутствие статистически значимых различий в отношениях и изменениях уровней креатинина на первые и вторые сутки после операции по сравнению с исходным уровнем свидетельствовало об однородности групп по функции почек и отсутствию влияния МСК на развитие острого почечного повреждения.

Вследствие ОПП потребовалось отсроченное назначение такролимуса в обеих группах исследования. Временной интервал до начала приема препарата был сходным: 3 (2; 4) суток для группы МСК и 2 (1; 4) суток для контрольной группы (MW, $p = 0,15$). Клиническое значение данного результата заключалось в

том, что сроки назначения такролимуса не оказывали влияния на течение послеоперационного периода и клинические исходы у пациентов обеих групп.

Учитывая, что в группе МСК наблюдались более низкая концентрация такролимуса и более быстрое восстановление функции почек (к 4-м СПО уровень мочевины в группе МСК составил 10,8 (8; 17,2) ммоль/л, в группе контроля – 14 (7,4; 18) ммоль/л (MW, $p = 0,03$), уровень креатинина – 80 (62; 123) и 101 (70; 132) мкмоль/л (MW, $p = 0,04$) соответственно), было проведено исследование корреляционной связи между показателями функции почек и концентрацией такролимуса.

На четвертые сутки послеоперационного периода установлена прямая корреляционная связь между концентрацией такролимуса и уровнем креатинина: высокая концентрация такролимуса соответствовала повышенному уровню креатинина (S_p , $p = 0,008$) (рис. 9).

Частота развития ранних послеоперационных осложнений в группах была приблизительно одинаковой и не имела статистически значимых различий (F , $p > 0,05$) (табл. 6).

Таблица 5

Характеристика групп по развитию ОПП в раннем послеоперационном периоде
Characteristics of groups according to development of AKI in the early postoperative period

Креатинин, мкмоль/л	Группа МСК (n = 14)	Контрольная группа (n = 14)	MW, p
1 СПО / 0 СПО	1,51 (1,13; 2,19)	1,58 (1,32; 1,88)	$p > 0,05$
2 СПО / 0 СПО	1,63 (1,28; 2,49)	1,64 (1,26; 2,43)	$p > 0,05$
Δ 1 СПО – 0 СПО	45 (8; 90)	41 (21; 53)	$p > 0,05$
Δ 2 СПО – 0 СПО	39 (13; 125)	50 (24; 84)	$p > 0,05$

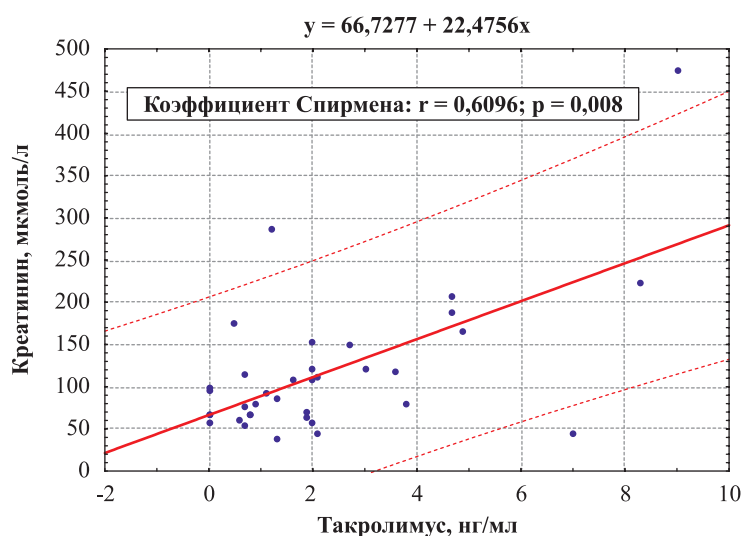


Рис. 9. Зависимость между уровнем креатинина и концентрацией такролимуса на 4-е СПО

Fig. 9. Correlation between serum creatinine levels and tacrolimus concentration on postoperative day (POD) 4

Таблица 6

Осложнения после трансплантации печени в раннем послеоперационном периоде**Early postoperative complications following liver transplantation**

Осложнения	Группа МСК (n = 14)		Контрольная группа (n = 14)	
Сосудистые	1	7%	0	0%
– артериальные (стеноз печеночной артерии)	1	7%	0	0%
Билиарные	2	14%	1	7%
– желчеистечение	1	7%	0	0%
– анастомотическая стриктура	1	7%	1	7%
ИОХВ (инфекция области хирургического вмешательства)	1	7%	2	14%
– поверхностная	0	0%	1	7%
– глубокая	1	7%	1	7%
Внутрибрюшное кровотечение	1	7%	1	7%

Длительность пребывания в отделении интенсивной терапии в группе МСК составила 3 (2; 4) суток, в группе контроля – 3 (2; 5) суток (MW, $p > 0,05$).

Длительность стационарного лечения после трансплантации пациентов в основной группе исследования составила 17 (14; 20) суток, что на двое суток меньше по сравнению с контрольной группой – 19 (15; 24) суток, однако эта разница не достигла статистической значимости (MW, $p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования продемонстрировали безопасность и эффективность внутрипортального введения мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени. Отсутствие местных и системных осложнений, связанных с введением МСК, а также нормальные показатели портальной гемодинамики и отсутствие микротромбозов в биоптатах подтвердили безопасность разработанной методики.

Анализ функциональных показателей трансплантата показал более быстрое восстановление печеночной функции в группе МСК, что проявлялось достоверно более низкими уровнями трансаминаз на 4-е СПО и более ранней нормализацией АСТ – к 10-м СПО.

Положительным результатом исследования явилась тенденция к снижению частоты и тяжести острого отторжения в группе МСК. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий при развитии иммунологической дисфункции трансплантата (21% в основной группе и 28% в группе контроля), в группе МСК наблюдались только случаи легкого и умеренного клеточного отторжения, тогда как в контрольной группе были зарегистрированы случаи тяжелого клеточного и гуморального отторжения. Данное наблюдение подтверждается достоверно более низкой экспрессией ММП-10 в биоптатах группы

МСК и указывает на менее выраженное иммунологическое повреждение трансплантата.

Наблюдаемые положительные эффекты внутрипортального введения МСК могут быть обусловлены несколькими механизмами действия этих клеток. Во-первых, МСК обладают способностью к паракринной секреции различных противовоспалительных факторов, включая IL-10 и TGF- β , которые подавляют активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов. Во-вторых, МСК могут модулировать функцию антиген-презентирующих клеток и продукцию провоспалительных цитокинов. В-третьих, МСК способствуют генерации регуляторных Т-клеток, которые играют ключевую роль в поддержании иммунологической толерантности к трансплантату [5–7].

Присутствие введенных МСК в трансплантате на 7-е СПО, подтвержденное FISH-анализом, свидетельствует о способности клеток к длительному присутствию в органе-мишени. Это может объяснять наблюдаемые иммуномодулирующие эффекты.

Важно отметить, что несмотря на низкий иммунотененциал МСК за счет слабой экспрессии молекул HLA I типа и отсутствия экспрессии антигенов HLA II типа, при использовании аллогенных мезенхимальных стволовых клеток существуют риски иммунного ответа со стороны реципиента [19]. Такой риск особенно актуален при повторных введениях клеточного продукта или недостаточной степени иммуносупрессии. В нашем исследовании мы не наблюдали клинически значимых иммунных реакций против МСК или случаев острого отторжения, ассоциированного с клеточной терапией. Вероятнее всего, этому способствовала проводимая после трансплантации печени стандартная иммуносупрессивная терапия, однократное и локальное введение МСК в трансплантат, а также непосредственное иммуносупрессивное воздействие МСК на иммунную систему.

Особого внимания в исследовании заслуживает возможность снижения концентрации такролимуса в группе МСК при сохранении адекватной иммуносупрессии. Учитывая выявленную корреляцию между уровнем такролимуса и креатинина, снижение концентрации ингибитора кальциневрина может способствовать уменьшению нефротоксичности и более быстрому восстановлению почечной функции, что наблюдалось в группе МСК к 4-м СПО.

Отсутствие различий в частоте других послеоперационных осложнений и тенденция к сокращению сроков госпитализации в группе МСК дополнительно подтверждают безопасность и потенциальную клиническую эффективность предложенной методики.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследований, изучавших применение клеточной терапии при трансплантации солидных органов. Q. Sun et al. (2018) при трансплантации почки показали безопасность и эффективность локального введения МСК через почечную артерию [8].

F. Popp et al. (2011) продемонстрировали безопасность инфузии МСК в воротную вену трансплантата печени [9]. Исследователями была показана возможность иммунозамещения МСК ингибиторов кальциневрина, а также эффективность клеточной терапии в комбинации с микофенолатами, что обосновывает предложенный нами протокол иммуносупрессии с минимизацией ингибиторов кальциневрина.

Таким образом, наши результаты подтверждают потенциал МСК в качестве дополнения к стандартной иммуносупрессивной терапии и дополняют имеющиеся данные об эффективности и безопасности клеточной терапии при трансплантации солидных органов, демонстрируя перспективность применения МСК для профилактики отторжения и улучшения функции трансплантата печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило разработать и внедрить безопасную методику внутриворотного введения мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени. Применение данного метода продемонстрировало ряд значимых клинических преимуществ.

1. Доказана безопасность технологии – отсутствие местных и системных осложнений при введении МСК.
2. Подтверждена эффективность метода в отношении функционального восстановления трансплантата, что проявилось более быстрой нормализацией печеночных показателей.
3. Установлено положительное влияние МСК на течение иммунологических процессов – тенденция к снижению тяжести эпизодов отторжения

и уменьшение экспрессии маркеров иммунного повреждения.

4. Выявлена возможность снижения концентрации такролимуса без потери эффективности иммуносупрессии, что способствует уменьшению нефротоксического эффекта ингибиторов кальциневрина. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения внутриворотной инфузии МСК как дополнительного компонента иммуносупрессивной терапии при трансплантации печени.

Авторы заявляют об отсутствии

конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ahmad J, Friedman S, Danczygier H. Mount Sinai expert guides. Hepatology. Wiley Blackwell; 2014.
2. Millson C, Considine A, Cramp M, Holt A, Hubscher S, Hutchinson J et al. Adult liver transplantation: UK clinical guideline – part 2: surgery and post-operation. *Frontline Gastroenterology*. 2020; 11 (5): 1–12. doi: 10.1136/flgastro-2019-101216.
3. Busuttil R, Klintmalm G. Transplantation of the liver. 3d ed. Elsevier; 2015.
4. Taner T. Liver Transplantation: Rejection and Tolerance. *Liver Transplantation*. 2017; 23 (S1): S85–S88. doi: 10.1002/lt.24840.
5. Vandermeulen M, Grégoire C, Briquet A, Lechanteur C, Beguin Y, Detry O. Rationale for the potential use of mesenchymal stromal cells in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (44): 16418–16432. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16418.
6. Wen F, Yang G, Yu S, Liu H, Liao N, Liu Z. Mesenchymal stem cell therapy for liver transplantation: clinical progress and immunomodulatory properties. *Stem Cell Research and Therapy*. 2024; 15 (320): 1–12. doi: 10.1186/s13287-024-03943-6.
7. Басок ЮБ, Пономарева АС, Грудинин НВ, Круглов ДН, Богданов ВК, Белова АД и др. Применение мезенхимальных стромальных клеток при трансплантации солидных органов: вызовы и перспективы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2025; XXVII (1): 114–134. Basok YuB, Ponomareva AS, Grudin NV, Kruglov DN, Bogdanov VK, Belova AD et al. Use of mesenchymal stem cells in solid organ transplantation: challenges and prospects. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2025; XXVII (1): 114–134. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2025-1-114-134.
8. Sun Q, Huang Z, Han F, Zhao M, Cao R, Zhao D et al. Allogeneic mesenchymal stem cells as induction therapy are safe and feasible in renal allografts: pilot results of a multicenter randomized controlled trial. *J Transl Med*. 2018; 16 (52): 1–10. doi: 10.1186/s12967-018-1422-x.
9. Popp F, Fillenberg B, Eggenhofer E, Renner P, Dillmann J, Benseler V et al. Safety and feasibility of third-

- party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation – a phase I study (MISOT-I). *J Transl Med.* 2011; 9 (124): 1–10. doi: 10.1186/1479-5876-9-124.
10. Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4): 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.
 11. Demetris A, Bellamy C, Hübscher S, O’Leary J, Randhawa P, Feng S et al. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant.* 2016; 16 (10): 2816–2835. doi: 10.1111/ajt.13909.
 12. Борбат АМ, Дубова ЕА, Гайнуллина ЕР, Лишчук СВ. Протокол гистологического исследования дисфункции трансплантата печени. *Архив патологии.* 2019; 81 (6): 71–73. Borbat AM, Dubova EA, Gainullina ER, Lishchuk SV. Protokol gistologicheskogo issledovaniya disfunktsii transplantata pecheni. *Arkhiv patologii.* 2019; 81 (6): 71–73. doi: 10.17116/patol20198106171.
 13. Шкалова ЛВ, Можейко НП, Ильинский ИМ, Мойсюк ЯГ, Цирульникова ОМ, Готье СВ. Диагностика острого отторжения по пункционным биоптатам аллотрансплантированной печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2011; 13 (3): 15–19. Shkalova LV, Mozheyko NP, Ilyinskiy M, Moisyuk YaG, Tsurulnikova OM, Gautier SV. The diagnosis of liver allograft acute rejection in liver biopsies. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2011; 13 (3): 15–19.
 14. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito A. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biology.* 2015; 44: 147–156. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.004.
 15. Федорук ДА, Курковский ЛВ, Садовский ДН, Петренко КИ, Лебедь ОА, Федорук АМ и др. Влияние гипотермической оксигенированной машинной перфузии на степень ишемического повреждения трансплантатов печени. *Военная медицина.* 2020; 2: 68–75. Fedoryuk DA, Kirkovsky LV, Sadovsky DN, Petrenko KI, Lebed OA, Fedoryuk AM et al. Influence of hypothermic oxygenated machine perfusion on the degree of ischemic damage of ecd liver grafts. *Military medicine.* 2020; 2: 68–75. [In Russ, English abstract].
 16. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S. ISCN (2020). An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. S. Karger AG; 2020.
 17. Minzdrav.gov.by [Интернет]. Клинический протокол «Трансплантация печени (взрослое и детское население)» (утвержден МЗ РБ 13.02.2023 № 31). [Internet] Klinicheskiy protokol «Transplantatsiya pecheni (vzrosloe i detskoe naselenie)» (utverzhdhen MZ RB 13.02.2023 № 31). <https://minzdrav.gov.by>.
 18. Kidney-international.org [Internet]. KDIGO. Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney International Supplements. 2012; 2 (16): 1–138. <https://kidney-international.org>.
 19. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12 (5): 383–396. doi: 10.1038/nri3209.

Статья поступила в редакцию 21.04.2025 г.
The article was submitted to the journal on 21.04.2025