

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ДИФФУЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Проф. В. П. МАЛЫЙ, канд. мед. наук О. В. ВОЛОБУЕВА

THE PROSPECTS OF CELLULAR THERAPY ADMINISTRATION IN CHRONIC DIFFUSE LIVER DISEASES

V. P. MALYI, O. V. VOLOBUYEVA

Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

Представлен обзор данных, которые посвящены стволовым гемопоэтическим клеткам. Показаны перспективы их применения в клинике для лечения патологии хронических диффузных заболеваний печени.

Ключевые слова: стволовая клетка, клеточная терапия, пуповинная кровь, цирроз печени.

The data about stem hemopoietic cells are reviewed. The prospects of their application in treatment of chronic diffuse liver diseases are shown.

Key words: stem cell, cellular therapy, umbilical blood, liver cirrhosis.

Роль стволовых клеток (СК) в процессах регенерации и создание на их основе новых терапевтических методов вызывают наибольшее количество дебатов. Это связано с рядом нерешенных фундаментальных вопросов, с проблемами этического и юридического характера. Тем не менее данное направление, получившее название регенеративной медицины, интенсивно развивается и именно с ним многие специалисты связывают медицину завтрашнего дня.

В настоящее время ведется огромная научно-исследовательская работа по изучению СК, они активно внедряются в клиническую практику, и все перспективы их использования еще предстоит открыть [1, 2].

СК — это клоногенные клетки, способные к самообновлению и дифференцировке в другие типы клеток. СК характеризуются наличием трех главных свойств:

— ассиметрично делятся, то есть при их пролиферации вместо образования двух одинаковых дочерних клеток одна дочерняя клетка становится коммитированной (commit — поручать, верить), способной стать более специализированной, а другая — остается неспециализированной СК;

— способны к самообновлению, т. е. репопулируют (пролиферируют без дифференцировки) на протяжении неопределенно длительного периода времени или даже в течение всей жизни организма (long-term subset);

— могут дифференцироваться в специализированные типы клеток (по крайней мере в клетки двух различных фенотипов), проходя стадию прогениторных клеток (progenitor — предшественник) из так называемого краткосрочно существующего

пула неспециализированных коммитированных СК (short-term subset).

После ряда биологических и клинических исследований уже к концу 70-х годов XX века стало очевидным, что богатым источником СК является пуповинная кровь. Первая в мире трансплантация кроветворных клеток пуповинной крови была осуществлена в 1988 году, после чего этот источник гемопоэтической ткани стал использоваться во многих странах: в Европе, Америке, Японии стали создаваться банки пуповинной крови. По мнению авторитетных ученых и медиков, создание подобных запасов должно стать одним из приоритетных направлений развития здравоохранения на ближайшие годы. На сегодняшний день сформулировано более 70 показаний к применению СК пуповинной крови. Наиболее эффективно их применение в онкологии и гематологии, используются они при аутоиммунных заболеваниях, патологии обмена веществ, иммунодефицитах, кардио- и нейродегенеративных нарушениях. Ведутся исследования по применению СК в лечении неврологических заболеваний, травм периферической и центральной нервной системы, патологии поджелудочной железы, для восстановления сетчатки глаза, слухового нерва. Постоянно в мировой литературе появляются новые данные о результативности терапии СК при тех или иных патологиях [3].

Н. Е. Broxmeyer, Е. F. Srouf [4] показали, что в пуповинной крови содержание ранних и коммитированных клеточных предшественников выше по сравнению с периферической кровью взрослых. Количество КОЕ-ГМ и их пролиферативный потенциал в пуповинной крови значительно превосходят периферическую кровь взрослых даже после

введения ростовых факторов [5]. В долгосрочных культурах клеток *in vitro* отмечена большая пролиферативная активность и жизнеспособность клеток пуповинной крови, чем костного мозга [6].

Известно, что клетки крови с иммунологическими маркерами CD34+ HLA DR- пролиферируют активнее, чем клетки с иммунофенотипами CD34+ HLA DR+, что подтверждалось в долгосрочной гемопоэтической культуре клеток *in vitro*. В работе [6] путем сравнения содержания клеток CD34+ в костном мозге и пуповинной крови установили более высокое их количество в костном мозге ($4,1 \pm 2,2\%$ и $1,16 \pm 0,6\%$ соответственно, ($p < 0,05$)). Однако в пуповинной крови отмечалось значительное превосходство клеток с иммунофенотипами CD34 + HLA DR- по сравнению с костным мозгом. Клетки крови с иммунофенотипом CD34 + CD38- также относят к примитивным клеточным предшественникам. Было показано [7], что клетки CD34+ CD38- пуповинной крови имеют более высокую клоногенную способность, чем тот же иммунофенотип костного мозга взрослого. Кроме того, клетки пуповинной крови с иммунофенотипом CD34+ CD38- пролиферируют быстрее в ответ на стимуляцию цитокинами (IL-3, IL-6, КСФ) и воспроизводят в 7 раз больше колоний в долгосрочных культурах, чем клетки костного мозга.

В исследованиях [7] было установлено, что отдельные субпопуляции клеток CD34+ менее дифференцированы, на что указывают низкий уровень поглощения радиоактивного rh123 (rh = rhodamine) и низкая экспрессия на их поверхности антигенов CD38. Важно также отметить, что сочетание антигенов Thy-1, CD34+ и CD45RA свидетельствует о высокой пролиферативной способности кровяных клеток (при исследованиях *in vitro*). Экспрессия таких антигенов на поверхности клеток пуповинной крови указывает, по-видимому, на их принадлежность к СК. Определено, что в этой крови содержатся клетки CD34+, которые не несут на себе линейных антигенов. Содержание таких клеточных субпопуляций с антигенами CD34+ /Lin- составляет около 1% от клеток с иммунофенотипом CD34+. Такие клеточные предшественники продуцируют В-лимфоидный и полипотентный миелоидный ряды, что также указывает на их принадлежность к СК.

Таким образом, наличие большого количества СК в пуповинной крови и высокая их репопулятивная способность позволяют использовать гемопоэтические клетки плацентарной крови для аллогенных трансплантаций.

Необходимо отметить, что в некоторых случаях пересадки с использованием клеток кордовой крови осуществлялись от доноров с неполной HLA совместимостью и результаты таких трансплантаций были вполне удовлетворительные. Этот факт, по-видимому, указывает на меньшую иммунореактивность клеток пуповинной крови, чем костного мозга.

Клинический анализ эффективности пересадки кровяных клеток пуповинной крови показал, что родственные трансплантации дают лучшие терапевтические результаты (годовая безрецидивная выживаемость составляла около 63%), чем неродственные (до 29%).

Тем не менее, несмотря на успехи, достигнутые в подобной трансплантации, до настоящего времени нет единого мнения о количестве (дозе) гемопоэтических клеток на 1 кг массы тела, необходимых для успешной пересадки. Так, по данным E. Gluckman [8], успешные трансплантации с использованием клеток пуповинной крови были выполнены реципиентам, которым вводилось не менее $3,7 \times 10^7$ ядросодержащих клеток (ЯСК) на 1 кг массы тела. Отмечалось также, что при применении доз менее 1×10^7 ЯСК на 1 кг массы тела значительно возрастал риск несостоятельности трансплантата и рецидива заболевания.

Для безопасной трансплантации клеток пуповинной крови, все образцы должны быть обследованы прежде всего на инфекции, передаваемые гематогенным путем, и генетические заболевания.

Установлено, что ежегодно в мире от цирроза печени умирает около 700 тыс человек и, по прогнозам ВОЗ, в ближайшие 10–20 лет ожидается существенное увеличение численности больных вирусным гепатитом С и циррозом печени, что повлечет за собой почти трехкратное увеличение случаев печеночно-клеточной декомпенсации. Несмотря на определенные успехи в терапии этих заболеваний, медикаментозное лечение цирроза печени по-прежнему остается трудной и порой невыполнимой задачей. Единственно эффективный метод в этом случае — трансплантация печени. Однако такой подход ограничен дефицитом донорских органов, а также возможностью их повторного инфицирования вирусом у больных хроническими вирусными гепатитами. Поэтому использование СК для стимуляции регенерации печени и лечения печеночно-клеточной недостаточности можно рассматривать в качестве возможного эквивалента органной трансплантации. Этот метод позволяет улучшить качество жизни и избежать трансплантации органа.

Печень характеризуется исключительно высокой регенеративной способностью. К настоящему времени имеется достаточно большое количество фактов, аргументирующих возможность дифференциации в гепатоциты СК, источником которых может являться пуповинная кровь. Так, введение клеток пуповинной крови SCID мышам с повреждением печени, индуцированным введением 2-AAF и частичной гепатэктомией, сопровождалось появлением в печени животных функционально полноценных гепатоцитов спустя 55 недель после трансплантации [6]. При выяснении природы предшественников гепатоцитов авторы обратили внимание, что *in vitro* дифференцировка в гепатоциты наблюдается только в тех случаях, когда культуры содержали субпопуляцию как CD34+,

так и CD34- клеток, что, по-видимому, свидетельствует о важности их межклеточной кооперации для эффективной дифференцировки в клетки печени. Способность СК пуповинной крови человека дифференцироваться в гепатоциты при введении облученным иммунодефицитным мышам была также продемонстрирована в исследованиях [9, 10]. В последнем случае авторам удалось охарактеризовать уникальную популяцию СК, экспрессирующую рецептор к молекуле комплемента C1qRr. Высокоочищенные Lin-, CD45+, C1qRr+ обладали способностью восстанавливать костный мозг и репопулировать печень.

Способность СК дифференцироваться в эпителиальные клетки печени зародила идею их использования в качестве стимулятора регенерации печеночной ткани при хронических диффузных заболеваниях печени [11]. Как выяснилось, значительную роль в этом процессе играет фактор повреждения печени и интенсивность репопуляции прямо зависит от выраженности печеночной дисфункции. Снижение количества гепатоцитов ниже критического уровня диктует необходимость их восполнения. При этом в ситуации, когда собственные резервы регенерации оказываются несостоятельными, перспектива заместительной клеточной терапии выглядит достаточно заманчивой [12]. Во-первых, СК легко получить, во-вторых, они обладают более высоким по сравнению со зрелыми гепатоцитами пролиферативным потенциалом и, соответственно, могут дать начало большему количеству дочерних клеток, способных дифференцироваться в гепатоциты. Кроме того, с этической точки зрения применение СК кордовой крови более приемлемо по сравнению с эмбриональными или фетальными клетками.

В этой статье мы хотим представить наши первые шаги в области клинического использования СК на примере патологии печени вирусной этиологии.

Больной Д., 54 лет 28 марта 2007 года поступил в клинику инфекционных болезней ХМАПО с жалобами на постоянную слабость, утомляемость, увеличение объема живота, отеки голеней и стоп, желтушность кожи и склер, зуд кожи в вечернее время, сухость и чувство горечи во рту, тяжесть в правом подреберье. После биохимического, серологического, молекулярно-генетического подтверждения был установлен диагноз: хронический вирусный гепатит С (анти-HCV core/NS, РНК HCV, 3a генотип) минимальной степени активности, фаза реактивации, цирроз печени, стадия субкомпенсации, портальная гипертензия, асцит.

Пациент считает себя больным с декабря 2004 года, когда при обследовании урологом в брюшной полости была обнаружена жидкость в объеме 200 мл, назначены диуретики. При очередном обследовании в 2005 г. были выявлены антитела к вирусу гепатита С. По этому поводу лечился протезфлазидом, гептралом, берлитионом. Однако проводимая терапия оказывала временное улучшение. В 2006 г. при УЗИ установлены признаки цирроза печени, асцита, портальной гипертензии. В ноябре этого же года состояние больного стало ухудшаться: появились более

выраженная общая слабость, утомляемость, несмотря на прием мочегонных препаратов периодически появлялись отеки на нижних конечностях. При осмотре состояние больного соответствовало средней степени тяжести. Адекватен, ориентирован. Кожные покровы землистые, с желтушным оттенком, склеры иктеричны. На передней брюшной стенке определяются телеангиэктазии. Язык влажный, обложен белым налетом. Живот увеличен, обе его половины симметрично участвуют в акте дыхания. Печень плотная, край закруглен, болезненна при пальпации, на 6–7 см выступает из-под края реберной дуги. Селезенка не пальпируется. Симптомы раздражения брюшины отрицательные. Моча темно-желтого цвета. По данным лабораторных обследований выявлены анемия (эритроциты $3,58 \cdot 10^{12}/л$), лейкопения (лейкоциты — $2,2 \cdot 10^9/л$), тромбоцитопения (тромбоциты — 80 тыс/мкл). Общий белок — 76 г/л, гамма-протеин — 33,4 %, тимоловая проба — 10,0, АЛТ — 1,08, общий билирубин — 31 ммоль/л. По результатам УЗИ — хронический гепатит, хронический холецистопанкреатит, цирроз печени, спленит, портальная гипертензия, асцит. Больному проведен курс лечения, включающий полиоксидоний № 10 в/в кап., веноимун № 3 в/в кап., аминокaproновая кислота в/в кап., трифас 10 мг, симепар 1 капс. x 2 раза, с целью иммунокоррекции в/в кап. введен препарат Гемокорд, содержащий криоконсервированные гемопоэтические клетки-предшественники. Лечение и обследование проводили после получения информированного согласия.

При осмотре через месяц отмечено улучшение состояния: купировалась повышенная утомляемость, исчезли отеки (в течение этого месяца не принимал мочегонные препараты), регрессировал землистый оттенок кожи. По данным лабораторного обследования: купировалась анемия (эритроциты $3,9 \cdot 10^{12}/л$, гемоглобин — 128 г/л), увеличилось количество лейкоцитов до $3,8 \cdot 10^9/л$, тромбоцитов до 150 тыс/мкл. Через 3 мес отмечалась положительная динамика вышеперечисленных показателей (общий билирубин — 23 ммоль/л, УЗИ — асцита нет, ПЦР — отрицательная).

Таким образом, через 1–3 мес после комплексного лечения с использованием трансплантации криоконсервированных гемопоэтических клеток-предшественников у больного отмечалась положительная динамика клинико-лабораторных показателей в виде снижения выраженности астено-вегетативного синдрома, асцита, анемии и тромбоцитопении, что в целом указывает на уменьшение выраженности печеночно-клеточной недостаточности.

Представленный нами пример является определенным шагом на пути использования стволовых клеток в комплексном лечении хронических гепатитов и цирроза печени. Полученные результаты свидетельствуют о возможности достижения значительного клинического эффекта у больных хроническим вирусным гепатитом в стадии цирроза печени. При этом лечение криоконсервированными гемопоэтическими клетками-предшественниками хорошо переносилось и не вызывало каких-либо побочных реакций.

Таким образом, несмотря на многие нерешенные вопросы относительно оптимального источника

СК, их количества, путей и кратности введения, адьювантной терапии цитокинами и ростовыми факторами, исследование СК и их использование для клеточной терапии при патологии печени имеет весомое экспериментальное обоснование, а также четкие перспективы и направления для дальнейшей разработки. Изучение молекулярно-генетических механизмов миграции СК в паренхиму печени, их приживания и дифференцировки в гепатоциты,

возможно, позволит повысить уровень и скорость процессов репопуляции/регенерации и получить хороший терапевтический эффект при использовании клеточных технологий. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят разработать более эффективные протоколы применения СК в комплексном лечении циррозов печени и определить четкие показания и противопоказания к их клиническому использованию.

Литература

1. Характеристика клеточных трансплантатов, содержащих стволовые клетки, применяемые для коррекции метаболических нарушений при осложненной патологии / В. В. Бойко, Е. М. Климова, И. А. Криворучко и др. // Харк. хірург. шк.— 2004.— № 3 (12).— С. 93–98.
2. О возможности трансплантации клеток фетальной печени различных сроков гестации с целью иммунокоррекции и профилактики полиорганной недостаточности / В. В. Бойко, И. А. Криворучко, Е. М. Климова и др. // Харк. хірург. шк.— 2004.— № 4 (13).— С. 145–151.
3. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Б. Е. Владимирская, О. А. Майорова, С. А. Румянцев, А. Г. Румянцев.— М.: ИД МЕДПРАКТИКА, 2005.— 392 с.
4. *Broxmeyer H. E., Srouf E. F.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // PNAS.— 2002.— Vol. 100 (2).— P. 645–650.
5. Стволовые клетки в современной медицине: настоящее и будущее / М. А. Пальцев, А. А. Иванов, В. Н. Смирнов, Ю. А. Романов // Молекулярн. медицина, 2006.— № 2.— С. 5–9.
6. *Falkenburg J. H. F., Lim F. T. H.* Использование пуповинной крови вместо костного мозга для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Росс. мед. журн.— 1996.— Т. 3, № 4.— С. 24–31.
7. Плацентарная кровь: альтернативный источник гемопоэтических стволовых клеток для трансплантаций. Создание банков пуповинной крови // www.gemobank.ru.
8. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group / E. Gluckman, Y. Rocha, A. Boyer-Chamard et al. // N. Engl. J. Med.— 1997.— Vol. 337, № 6.— P. 373–381.
9. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice / F. Ishikawa, C. J. Drake, S. Yang et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 2003.— Vol. 996, № 1.— P. 174–185.
10. *Danet G. H., Luongo G. L., Bulter G.* ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential // PNAS.— 2002.— Vol. 99.— P. 10441–10445.
11. *Goff J. P., Peterson B. E.* Bone marrow transplantation for hepatic regeneration // Патент № WO0050048, 2000.
12. Cell-based therapy for liver diseases / Di C. Campli, M. Nestola, A. C. Piscaglia et al. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.— 2003.— Vol. 7.— P. 41–44.

Поступила 20.11.2007