

## КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

### Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами

А.П. Киясов<sup>1,2</sup>, А.Х. Одинцова<sup>3</sup>, А.А. Гумерова<sup>1</sup>, И.М. Газизов<sup>1,2</sup>, А.З. Фаррахов<sup>3</sup>,  
Г.Г. Кундакчян<sup>2</sup>, С.Р. Абдулхаков<sup>1</sup>, Н.А. Черемина<sup>3</sup>, Т.С. Йылмаз<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра нормальной анатомии, Казанский государственный медицинский университет

<sup>2</sup> Банк стволовых клеток, Казанский государственный медицинский университет

<sup>3</sup> Республиканская клиническая больница МЗРТ, Казань

#### Transplantation of autologous hemopoietic stem cells to patients with chronic hepatitis

A.P. Kiasov<sup>1,2</sup>, A.Kh. Odintsova<sup>3</sup>, A.A. Gumerova<sup>1</sup>, I.M. Gazizov<sup>1,2</sup>, A.Z. Farrakhov<sup>3</sup>, G.G. Kundakchyan<sup>2</sup>,  
S.R. Abdulkhakov<sup>1</sup>, N.A. Cheremina<sup>3</sup>, T.S. Iilmaz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy

<sup>2</sup> Stem cell bank, Kazan State Medical University

<sup>3</sup> Republic Clinical Hospital of the Tatarstan Public Health Ministry

В статье изложены результаты первой фазы клинических исследований эффективности аутотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами в стадии тяжелого фиброза печени. После стимуляции выхода предшественников гемопоэза в периферическую кровь «Нейпогеном» выделенные гемопоэтические стволовые клетки вводили в чревной ствол, что обеспечивало доставку трансплантированных клеток в печень как с артериальным, так и с венозным кровотоком. В качестве критериев оценки эффективности трансплантации наряду с клиническими и биохимическими показателями использовали результаты морфологического анализа (индекс гистологической активности) и иммуногистохимического окрашивания (выявление пролиферативной активности, выраженности активации миофибробластов и капилляризации синусоидов). Результаты исследования показали, что трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток в чревной ствол больным хроническим гепатитом в стадии тяжелого фиброза является безопасной процедурой. Через месяц после трансплантации улучшаются общее состояние больного, показатели функциональных проб печени, уменьшается выраженность некрозов и воспаления и происходят качественные структурные изменения в печени – значительно снижается пролиферация гепатоцитов, уменьшается число миофибробластов в паренхиме, что приводит к разрешению перисинусоидального фиброза и восстановлению нормального строения синусоидных капилляров. Полученные результаты позволяют сделать выводы о перспективности данного метода лечения для подавления прогрессирования гепатита и фиброза печени и о высокой информативности иммуногистохимических методов в оценке эффективности трансплантации.

**Ключевые слова:** хронические гепатиты, гемопоэтические стволовые клетки, аутотрансплантация, иммуногистохимия.

Согласно современным представлениям, восстановление поврежденных тканей и органов взрослого организма осуществляется при участии низкокодифференцированных или стволовых клеток. Основным источником стволовых клеток является костный мозг, способный генерировать клетки-предшественники для большого числа тканей организма. В экспериментах на животных была показана возможность стимуляции регенерации печени аутогенными стволовыми клетками костного мозга [1, 2] и аллогенными стволовыми клетками пуповинной крови [3]. Получены первые поло-

The results of the clinic trial first phase of autotransplantation efficacy of hemopoietic stem cells to patients with chronic hepatitis in a severe hepatic fibrosis stage are given in the article. After hemopoietic precursors having been stimulated by "Neipogen" into peripheral blood, isolated hemopoietic stem cells were introduced into the celiac trunk. It provided the delivery of transplanted cells into the liver with both the arterial and venous blood flow. As the assessment criteria of transplantation efficacy the morphologic analysis results (the histologic activity index) and immunohistochemical staining (detection of proliferation activity, myofibroblasts activation and capillarization of sinusoids) were used together with clinical and biochemical values. The investigation results show that transplantation of autologous hemopoietic stem cells into the celiac trunk of patients with chronic hepatitis in the stage of severe fibrosis is a safe procedure. A month after transplantation the patient's general condition and the functional tests indices improved, the necrosis and inflammation became less pronounced, qualitative structure alterations within the liver occurred – that is hepatocytes proliferation decreased significantly, the number of myofibroblasts was reduced within the parenchyma that resulted in resolving of perisinusoidal fibrosis and restoration of the normal structure of sinusoid capillaries. The data obtained confirm that this method can be used to suppress the progression of hepatitis and fibrosis formation within the liver, as well as immunohistochemical methods provide reliable information on the efficacy of transplantation.

**Key words:** chronic hepatitis, hemopoietic stem cells, autotransplantation, immunohistochemistry.

жительные результаты лечения заболеваний печени у людей – установлена высокая эффективность применения аллогенных стволовых клеток пуповинной крови при лечении вирусных гепатитов [4]. Более того, стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup>, полученные из крови больных и введенные в печень через воротную вену, в 2,5 раза ускоряли процесс регенерации печени после резекции опухоли [5]. Положительная динамика функциональных проб печени была отмечена в рамках первой фазы клинических исследований, когда больным хроническими гепатитами (5 человек)

была проведена трансплантация аутогенных стволовых клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup> [6]. Таким образом, к моменту начала нашей работы имелись теоретические, экспериментальные и клинические предпосылки для проведения ограниченных клинических испытаний применения аутологичных гемопоэтических клеток в терапии хронических гепатитов.

### Методика исследования

На первом этапе после тщательного анализа литературы нами был разработан протокол клинических исследований. Отличительными чертами разработанного протокола являются: 1) способ трансплантации стволовых клеток в печень; 2) критерии оценки эффективности трансплантации.

### Выбор способа трансплантации

В экспериментах на животных для стимуляции регенерации печени стволовые клетки чаще всего вводят интрабрюшинно или в селезёнку, из которой они через воротную вену поступают в печень. В протоколах клинических исследований по применению стволовых клеток при хронических гепатитах и после резекции печени клетки вводили либо в периферический кровоток [7] (при этом большая часть клеток диссеминировалась по организму), либо в воротную вену — в этом случае все клетки поступали в печень с венозной кровью [5, 6].

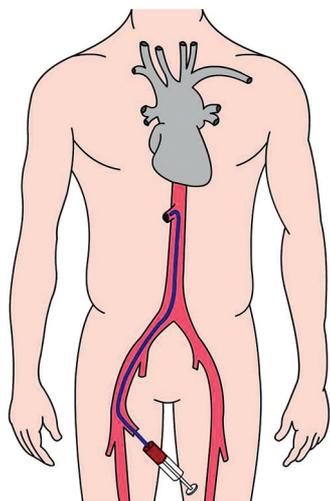


Рис. 1. Схема введения стволовых клеток в чревный ствол

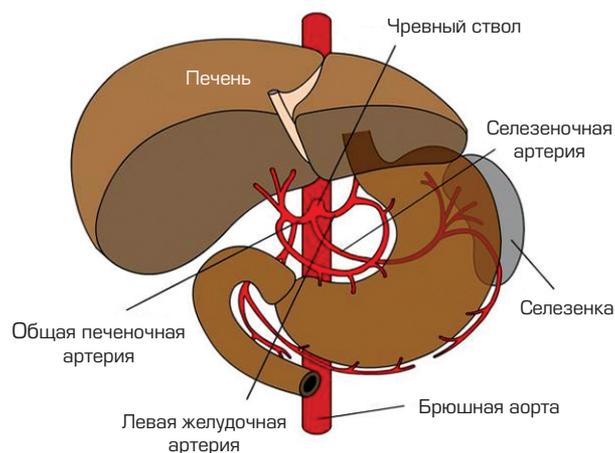


Рис. 2. Ветви чревного ствола (схема)

Целью нашего исследования было изучение возможности использования стволовых клеток в лечении не просто хронических гепатитов, а хронических гепатитов в стадии тяжелого фиброза и цирроза. В этой стадии у больных развивается портальная гипертензия, причем введение клеток в воротную вену на фоне портальной гипертензии может вызвать внутреннее кровотечение в месте введения иглы. Исходя из этого, мы предположили, что клетки безопаснее вводить не в воротную вену, а в артериальный кровоток. Причем стволовые клетки целесообразнее вводить не в печеночную артерию, а в чревный ствол (рис. 1), от которого отходят печеночная артерия, левая желудочная артерия и селезеночная артерия (рис. 2). В результате такого введения часть клеток сразу попадает в печень по общей печеночной артерии, а те клетки, которые ушли к желудку и селезенке, могут попасть в печень с венозной кровью через воротную вену (рис. 3).

Преимуществом предложенного метода введения, по нашему мнению, является не только его безопасность, но и возможность воздействовать стволовыми клетками на разные участки печеночной доли. Дело в том, что кровь в печень поступает по двум сосудам — воротной вене (венозная кровь от всех непарных органов брюшной полости) и печеночной артерии (артериальная кровь из аорты). Венозная кровь составляет до 80% всей крови, проходящей через печень, и из мелких портальных вен она напрямую поступает в синусоидные капилляры железы. Артериальная кровь, перед тем как попасть в синусоиды, снабжает питательными веществами и кислородом все структуры портальных трактов и, в частности, желчные протоки [8]. Даже при легком перипортальном фиброзе происходят изменения в желчных протоках, которые сначала приводят к их компенсаторной пролиферации (дуктулярной реакции), а в дальнейшем к дуктопении с нарушением экскреторной функции печени [9]. В предложенном нами методе стволовые клетки могут действовать как внутри доли (с венозной кровью), так и в области портальных трактов (с артериальной кровью).

### Критерии оценки эффективности трансплантации

Главным достоинством разработанного протокола являются методы оценки эффективности использования стволовых клеток в лечении хронических гепатитов. Они заключаются в том, что мы дополнительно ввели в шкалу оценки прижизненную морфологическую диагностику, которая является «золотым стандартом» диагностики хронических гепатитов. Ни в одном из трех клинических исследований [5–7] этот метод не был использован — эффективность

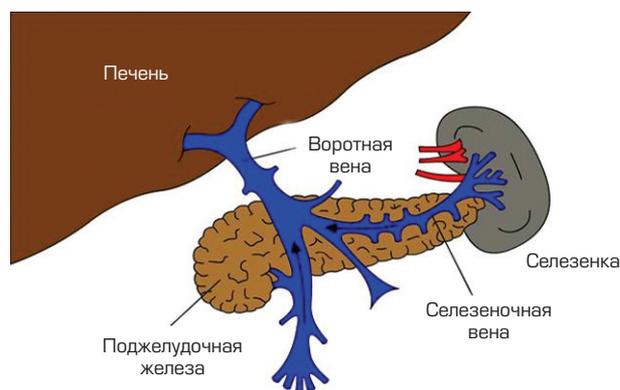


Рис. 3. Формирование воротной вены печени (схема)

оценивали по биохимическим показателям функции печени, что вызывало справедливую критику в адрес авторов со стороны оппонентов.

Кроме того, в протокол исследований, наряду с обязательным определением степени активности и стадии заболевания, были введены методы иммуногистохимической оценки: 1) пролиферативной активности клеток печени (по экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток, Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA); 2) активации миофибробластов (по экспрессии альфа-гладкомышечного актина,  $\alpha$ -ГМА); 3) капилляризации синусоидов (по экспрессии CD34).

Уровень пролиферации позволяет судить о выраженности регенераторного ответа гепатоцитов на повреждение.

$\alpha$ -ГМА – это один из контрактильных белков гладкой мышцы, который в здоровой печени обнаруживается только в мышечных клетках сосудов печени. При хроническом повреждении печени происходит трансдифференцировка перисинусоидальных клеток печени в миофибробласты, которые усиленно синтезируют коллаген, что приводит к развитию фиброза. Маркером миофибробластов является  $\alpha$ -ГМА. Появление  $\alpha$ -ГМА-позитивных миофибробластов, таким образом, приводит к отложению новых волокон коллагена и прогрессированию фиброза.

CD34 – это гликопротеин, который находится на наружной поверхности мембраны эндотелиальных клеток и прогениторных кроветворных клеток. В частности, его используют при выделении стволовых кроветворных клеток в качестве их маркера. При морфологическом исследовании биоптатов CD34 интересовал нас как маркер эндотелия синусоидов печени. Дело в том, что эндотелий синусоидов печени отличается от эндотелия капилляров других органов. Во-первых, он фенестрированный, во-вторых, у него нет сплошной базальной мембраны, и поэтому на мембране эндотелиальных клеток нет молекулы CD34. CD34 появляется в эндотелии синусоидов только при так называемой капилляризации последних. В этом случае в пространстве Диссе откладывается коллаген (перисинусоидальный фиброз), формируется подобие базальной мембраны и нарушается диффузия веществ из крови к гепатоцитам. Таким образом, появление CD34 в синусоидах позволяет судить о нарушении гемодинамики в синусоидах печени.

Для проведения морфологического анализа биоптаты печени фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Иммуногистохимическое окрашивание срезов печени проводили стрептавидин-биотиновым методом [10] с использованием коммерческих моноклональных антител к PCNA,  $\alpha$ -ГМА, CD34 и визуализационных систем фирм DAKO (Дания) и NOVOCASTRA (Великобритания).

#### Отбор больных

Критерием включения пациентов в программу клинических исследований было, согласно утвержденному протоколу, наличие хронического токсического (этанолового) гепатита и тяжелого фиброза печени. В настоящий момент в клиническом исследовании находятся 3 пациента и отобрано еще 12. Все больные до включения в программу исследований прошли курс стационарного лечения, состоявший из гепатотропных препаратов (Урсосан, Карсил и т.д.). У пациентов не было выраженных изменений функциональных проб печени: отмечены повышение аланинаминотрансферазы (АЛТ, в среднем в 2 раза) и  $\gamma$ -глутаминтранспептидазы ( $\gamma$ -ГТП, в 2–4 раза) и снижение протромбинового индекса (до 70%). При ультразвуковом исследовании печени обнаружены повышение эхогенности и диффузная неоднородность ее паренхимы. Перед началом лечения всем больным была проведена пункционная биопсия печени.

#### Получение стволовых клеток

Стимуляцию выхода в периферическую кровь предшественников гемопоэза проводили с помощью «Нейпогена» в дозе 480 мг подкожно в течение 4–5 дней. На пятый день стимуляции, когда наблюдался выраженный лейкоцитоз и пик числа моноцитов в периферической крови, проводили выделение фракции мононуклеаров на клеточном сортере MSC+ согласно протоколу изготовителя (Haemonetics, USA). Анализ выделенных клеток показал, что количество ядро-содержащих мононуклеаров составило  $1,7 \times 10^6$  (1-й больной),  $1,4 \times 10^6$  (2-й больной),  $2,0 \times 10^6$  (3-й больной) в 1 мл. Двадцать мл клеточного концентрата были введены в чревный ствол в течение трех часов после выделения. Введение клеток в чревный ствол прошло без осложнений. Уже на следующий день пациенты вели обычный образ жизни.

#### Результаты и обсуждение

Наблюдение за больными в течение 4-х недель после введения стволовых клеток показало улучшение общего самочувствия, повышение работоспособности, исчезновение слабости и дискомфорта в правом подреберье. Через месяц после введения стволовых клеток у всех больных снизились показатели цитолиза, повысился протромбиновый индекс, произошло снижение  $\gamma$ -ГТП (в одном случае до нормы) (табл. 1).

Согласно протоколу, всем больным была проведена пункционная биопсия печени до трансплантации стволовых клеток и через месяц после трансплантации. Сравнительный анализ индекса гистологической активности (ИГА) представлен в табл. 2.

Таблица 1. Показатели функциональных проб печени до трансплантации стволовых клеток и через 1 месяц после трансплантации

Показатель	1-й больной		2-й больной		3-й больной	
	до	после	до	после	до	после
АЛТ (N – 40 Е/л)	41	36	66	31	7	12
АСТ (N – 45 Е/л)	40	26	93	55	71	52
$\gamma$ -ГТП (N – 12–64 Е/л)	328	235	137	51	152	99
ПТИ (N – 80–100%)	73	82	69	76	69	84

Таблица 2. Показатели индекса гистологической активности (ИГА) до трансплантации стволовых клеток и через 1 месяц после трансплантации

Показатели ИГА	1-й больной		2-й больной		3-й больной	
	до	после	до	после	до	после
Внутридольковые дегенерации	4	3	4	3	3	1
Перипортальный некроз	6	6	6	5	6	6
Портальное воспаление	4	3	3	2	3	2
ИГА*	14	12	13	10	12	9
Фиброз	3	3	3	3	3	3

\*ИГА от 1 до 3 – хронический гепатит с минимальной активностью; ИГА от 4 до 8 – слабо выраженная активность хронического гепатита; ИГА от 9 до 12 – умеренная активность хронического гепатита; ИГА от 13 до 18 – тяжелый хронический гепатит.

Через месяц после трансплантации у всех больных произошло снижение ИГА на 2–3 балла. За счет чего произошло это снижение? В первую очередь, за счет уменьшения внутридольковых некрозов и дегенераций паренхимы и портального воспаления. К сожалению, выраженность некрозов вокруг портальных трактов не изменилась, и в биоптатах отмечены порто–портальные мостовидные некрозы. Эти некрозы всегда были локализованы в области порто–портальных соединительнотканых септ, за счет которых у больных был диагностирован тяжелый фиброз (3 балла).

Очевидно, что один месяц – недостаточный срок для разрешения фиброза. В то же время снижение ИГА за счет уменьшения внутридольковых дегенераций и портального воспаления отражает позитивные изменения в состоянии печени после трансплантации. Более того, благоприятные морфологические изменения в паренхиме печени объясняют и положительную динамику биохимических показателей.

Наиболее выраженным морфологическим изменением, которое мы обнаружили, было исчезновение соединительной ткани из пространства Диссе. До трансплантации у всех больных был выявлен перисинусоидальный фиброз, а через месяц после трансплантации створчатых клеток мы не обнаружили отложения коллагеновых волокон между эндотелием и гепатоцитами (рис. 4).

Согласно протоколу, биоптаты окрашивали антителами против PCNA,  $\alpha$ -ГМА и CD34. Данные иммуногистохимического исследования представлены в таблице 3. Два факта обращают на себя внимание – резкое снижение пролиферативной активности гепатоцитов и исчезновение CD34 в мембранах эндотелия синусоидов после трансплантации.

Высокая пролиферативная активность в гепатоцитах до трансплантации (рис. 5А) указывает на напряженность регенераторного ответа. Такого рода напряженность всегда наблюдается при повреждении гепатоцитов и является ответной реакцией на уменьшение клеточной массы или повреждение гепатоцитов. Через месяц после трансплантации число пролиферирующих гепатоцитов было в пределах 1–5%, что является показателем, близким к норме (рис. 5Б).

Интересные изменения произошли после трансплантации створчатых клеток с эндотелием синусоидов. У всех больных до трансплантации была выражена капилляризация синусоидов – эндотелиальные клетки экспрессировали CD34 (рис. 6А). Такого рода изменения фенотипа эндотелия в синусоидах печени указывают на то, что фенестрированный эндотелий стал менее проницаемым. Через месяц после трансплантации ситуация кардинально изменилась – в синусоидах обнаруживали лишь единичные CD34<sup>+</sup> эндотелиальные клетки (рис. 6Б).

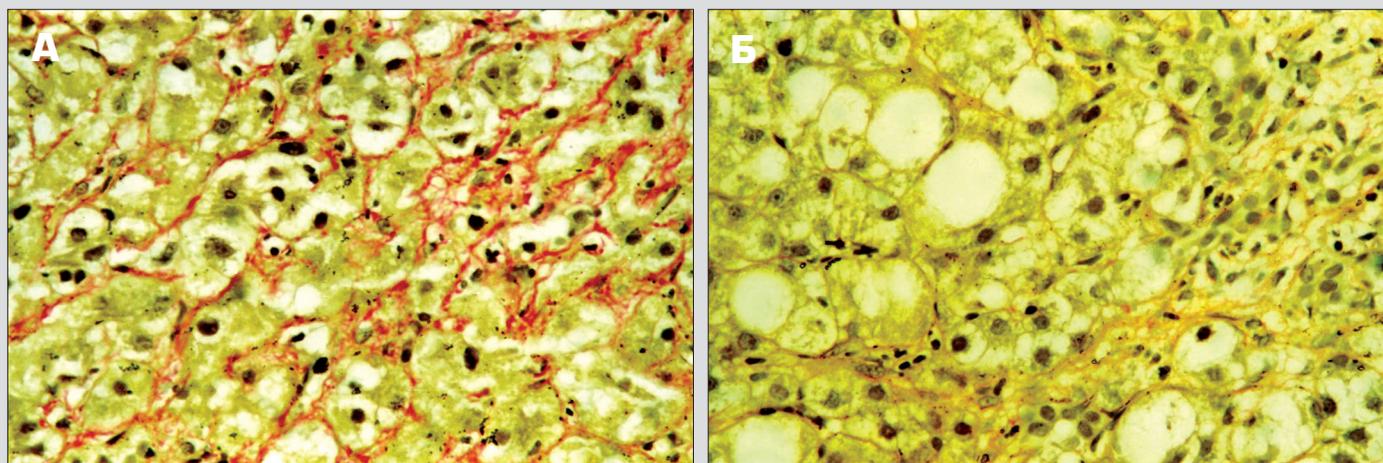


Рис. 4. Перисинусоидальный фиброз: А – до трансплантации; Б – через 1 месяц после трансплантации. Окраска по Ван-Гизону,  $\times 400$

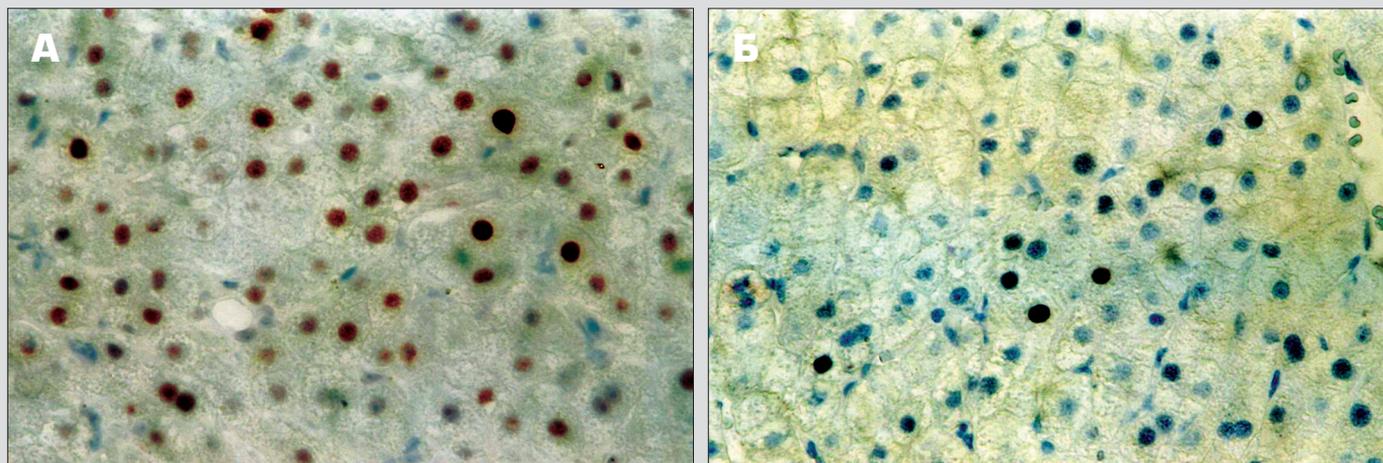


Рис. 5. Проллиферативная активность гепатоцитов: А – до трансплантации; Б – через 1 месяц после трансплантации. Окрашивание антителами к PCNA (ядра пролиферирующих гепатоцитов – красного цвета),  $\times 400$

Таблица 3. Паттерн экспрессии антигенов в биоптатах печени до трансплантации стволовых клеток и через 1 месяц после трансплантации

Антиген	1-й больной		2-й больной		3-й больной	
	до	после	до	после	до	после
PCNA, % гепатоцитов	В одном узле до 50	1	30	1	80–90	1–5
$\alpha$ -ГМА	В сосудах, септах и синусоидах	В сосудах	В сосудах и септах	В сосудах и септах	В сосудах и септах	В сосудах
CD34	В эндотелии, капилляризация	В единичных эндотелиальных клетках	В эндотелии, капилляризация	В единичных эндотелиальных клетках	В эндотелии, капилляризация	В единичных эндотелиальных клетках

Определенные изменения наблюдались и в экспрессии  $\alpha$ -ГМА. До трансплантации у всех больных внутри соединительнотканых септ присутствовали миофибробласты (рис. 7А), что указывало на продолжающийся синтез компонентов соединительной ткани и прогрессирование фиброза. У одного больного миофибробласты были обнаружены и в синусоидах, что является неблагоприятным прогностическим

фактором в плане дальнейшего фибрирования паренхимы печени. После трансплантации количество миофибробластов заметно уменьшилось, и немногочисленные  $\alpha$ -ГМА<sup>+</sup> клетки обнаруживали только в пределах уже сформированных соединительнотканых септ, в основном же  $\alpha$ -ГМА присутствовал в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов (рис. 7Б).

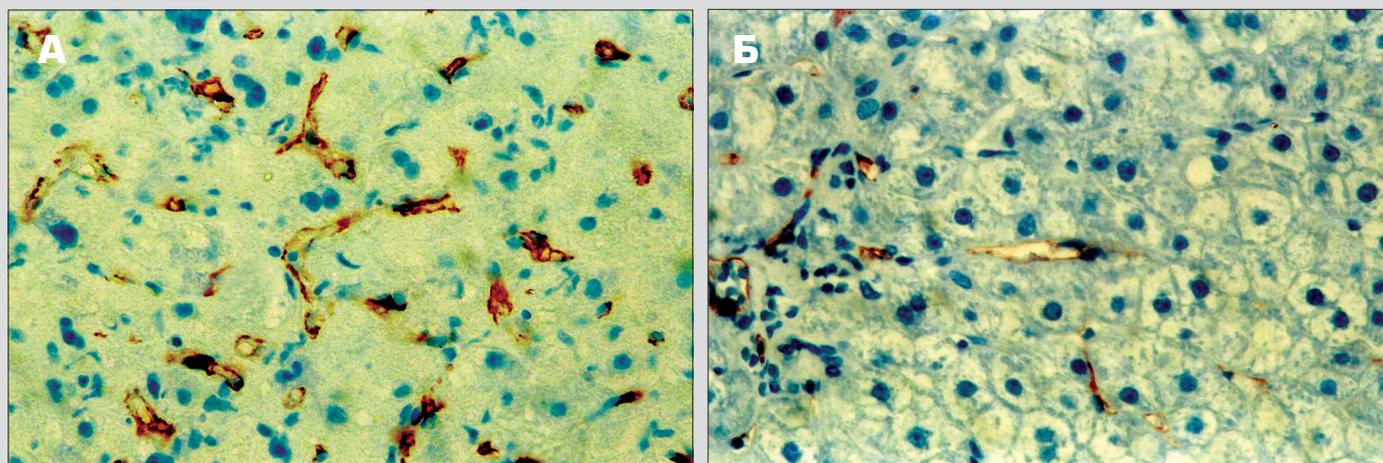


Рис. 6. Капилляризация синусоидов: А – до трансплантации (выраженная); Б – через 1 месяц после трансплантации (единичные CD34<sup>+</sup> клетки в синусоидах). Окрашивание с антителами к CD 34 (продукт иммуногистохимической реакции – красного цвета),  $\times 400$

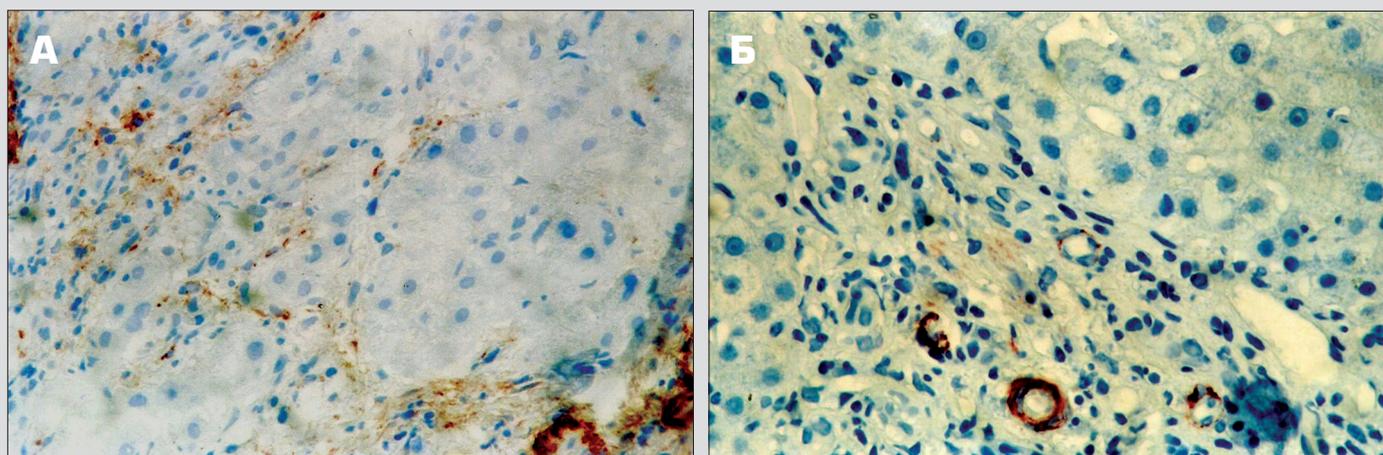


Рис. 7. Активация миофибробластов: А – до трансплантации (выраженная); Б – через 1 месяц после трансплантации (единичные клетки). Окрашивание с антителами к  $\alpha$ -ГМА (продукт иммуногистохимической реакции – красного цвета),  $\times 400$

Поскольку именно миофибробласты являются основным источником соединительной ткани в регенерирующей печени, уменьшение их числа объясняет как восстановление нормальной структуры синусоидных капилляров, так и исчезновение перисинусоидального фиброза.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток в чревной ствол больным хроническим гепатитом в стадии тяжелого фиброза является безопасной процедурой. Через месяц после трансплантации аутогенных гемопоэтических стволовых клеток улучшаются общее состояние больного и показатели функциональных проб печени, происходят положительные изменения в морфологии печени (снижается индекс гистологической активности за

счет уменьшения выраженности портального воспаления и внутридольковых некрозов). Однако самым важным результатом трансплантации гемопоэтических стволовых клеток является то, что в печени происходят качественные структурные изменения – значительно снижается пролиферация гепатоцитов, уменьшается число миофибробластов в паренхиме, что приводит к разрешению перисинусоидального фиброза и восстановлению нормального строения синусоидных капилляров. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности данного метода лечения для подавления прогрессирования гепатита и фиброзирования печени и о высокой информативности иммуногистохимических методов в оценке эффективности трансплантации.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Masson S., Harrison D.J., Plevris J.N. et al. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem cells* 2004; 22(6): 897–907.
2. Fujii H., Hirose T., Oe S. et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Hepatol.* 2002; 36(5): 653–9.
3. Kakinumaa S., Tanakaa Y., Chinzeia R. et al. Human Umbilical Cord Blood as a Source of Transplantable Hepatic Progenitor Cells. *Stem Cell* 2003; 21: 217–27.
4. Tang X.P., Yang X., Tan H. et al. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 2003; 9(9): 1999–2003.
5. Esch J.S., Knoefel W.T., Klein M. et al. Portal application of autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23(4): 463–70.
6. Gordon M.Y., Levicar N., Pai M. et al. Characterization and clinical application of human CD34<sup>+</sup> stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24(7): 1822–30.
7. Terai S., Ishikawa T., Omori K. et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24(10): 2292–8.
8. Gaudio E., Franchitto A., Pannarale L. et al. Cholangiocytes and blood supply. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(22): 3546–52.
9. Chen Y.K., Zhao X.X., Li J.G. et al. Ductular proliferation in liver tissues with severe chronic hepatitis B: an immunohistochemical study. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(9): 1443–6.
10. Киясов А.П. Современные технологии морфологических исследований. Методическое пособие для студентов, аспирантов и врачей-патологов. Казань: КГМУ; 2001.

Поступила 15.11.2007